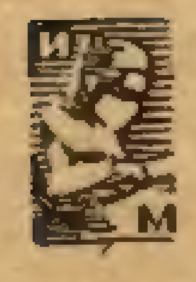
БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Медицина · 1974


БИОХИМИЯ

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ



Москва „Медицина" 1974

УДК 576.851.45

И. В. ДОМАРАДСКИЙ, Е. П. ГОЛУБИНСКИЙ,
С. А. ЛЕБЕДЕВА и Ю. Г. СУЧКОВ

ИЗДАНИЕ ОДОБРЕНО И РЕКОМЕНДОВАНО К ПЕЧАТИ
РЕДАКЦИОННО-ИЗДАТЕЛЬСКИМ СОВЕТОМ
ПРИ ПРЕЗИДИУМЕ АМН СССР

Книга посвящена современным биологическим аспектам проблемы чумы — биохимии и генетике ее возбудителя. Представленный материал свидетельствует о том, что такие исследования — необходимый этап для осуществления последующей направленной изменчивости организмов, а также углубления наших знаний о взаимоотношениях между паразитом и хозяином. Это в свою очередь необходимо для решения ряда проблем эпидемиологии, эпизоотологии и патогенеза инфекции.

В книге представлены оригинальные исследования группы авторов, впервые обобщены современные литературные материалы, подведены итоги и намечены перспективы дальнейших исследований.

Данные по биохимии и генетике чумного микроба даются в сравнительном плане; одновременно анализируются соответствующие результаты исследований других, хорошо изученных микроорганизмов. Такой подход делает книгу полезной не только для специалистов-чумологов, но и для микробиологов широкого профиля, научных и практических медицинских работников и студентов, интересующихся проблемами инфекционной патологии.

Б $\frac{0532-429}{039(01)-74}$ 246—74

ОГЛАВЛЕНИЕ

Главное для каждого живого существа — это выжить как индивидууму и как виду.

М. Кальвин.

ВВЕДЕНИЕ

Борьба с инфекционными заболеваниями еще долго будет оставаться одной из главных задач человечества. Мы убеждаемся в справедливости высказывания Ш. Николя: «Народятся новые, медленно исчезнут некоторые старые болезни, а те, которые останутся, не будут иметь в точности те формы, под которыми мы их знаем теперь». И дело не только в возбудителях, обладающих огромной адаптационной способностью, но также в людях, активно воздействующих на природу и подчас создающих условия для возникновения и распространения инфекций.

К числу заболеваний, с которыми долго придется считаться человечеству, принадлежит чума. Оснований для такого пессимизма несколько:

1. Существуют многочисленные природные очаги, и мы не знаем многих причин возникновения и угасания вспышек этой инфекции. Правда, опыт Советского Союза намечает пути и перспективы борьбы с чумой в ее естественных резервациях. К сожалению, подобный опыт является уникальным, и не известно, удастся ли его распространить на другие страны и континенты, ведь в каждом конкретном случае надо исходить из местных социально-биологических условий.

2. Чума особенно страшна, когда меняется доминирующий механизм передачи и из инфекции кровяной она по существу превращается в инфекцию дыхательных путей (как это бывает при эпидемиях легочной чумы). Тогда чума «отрывается» от своих природных очагов и воздействие на механизмы ее передачи резко осложняется.

3. Чумной микроб превосходит по агрессивности многие другие микроорганизмы.

4. У современной чумы появились новые особенности.

Поясним последнее положение. В настоящее время при наличии методов лечения сульфаниламидами и антибиотиками продление сроков жизни больных до момента, когда начинает развиваться активный иммунитет, не является редкостью даже в случае первичной легочной формы.

В результате этого в течении чумы стала проявляться известная цикличность, чего, естественно, нельзя было наблюдать раньше, до внедрения в практику новых методов терапии.

Одним из следствий цикличности стала склонность к рецидивам. Дело в том, что к моменту развития активного иммунитета и организации пневмонических фокусов возникают новые очаги инфекции. Они локализуются в корневых лимфатических узлах легких, куда лечебные препараты проникают с трудом. Эти прикорневые очаги, или «вторичные легочные бубоны», можно рассматривать как «пороховые склады»: при отступлении от схемы лечения или преждевременном его прекращении могут возникать рецидивы.

Участились случаи как специфических, так и неспецифических осложнений. Раньше они наблюдались преимущественно при затяжном течении бубонной чумы и исключительно редко при первичной легочной или септических формах (возможно, просто не успевали развиться).

Возросшая роль интоксикации, преодоление которой выдвигается на одно из первых мест. Интоксикация связана как с интенсивным распадом микробов под влиянием лечения сульфаниламидами и антибиотиками, так и с наличием у указанных терапевтических средств побочных свойств.

Наконец, возможно появление форм возбудителя, устойчивых к лекарственным веществам. В эксперименте доказана легкость их возникновения. Что касается естественных условий, то такая возможность также вполне реальна.

Все сказанное больше чем когда-либо выдвигает на первый план необходимость изучения возбудителя чумы в различных аспектах и главным образом с позиций

биохимии и генетики. Только таким путем, возможно, удастся в конце концов понять суть вирулентности и, что особенно важно, «эпидемической» вирулентности чумного микроба.

Исходя из изложенного, нельзя согласиться с тем, кто считает, что «чума перестала быть чумой», а уж если она где-нибудь и возникнет, то антибиотики справятся с ней. Даже новая история дает много примеров того, как безжалостно платила чума за подобное легкомыслие. Мы не хотим сказать, что современная наука не вооружила нас новыми средствами борьбы. Просто мы предостерегаем от переоценки наших возможностей.

Вопросам эпизоотологии и эпидемиологии чумы посвящено немало работ. Нельзя сказать, что и ее возбудитель изучен плохо (с позиций микробиологии). Однако о физиологии и генетике Yersinia pestis известно очень мало.

Начиная с 50-х годов накоплены большие материалы по физиологии возбудителя чумы, причем основная масса их получена в Советском Союзе. Несколько позже началось изучение и генетики этого микроба. Помимо разрозненных работ, отрывочные сведения о результатах биохимических и генетических исследований возбудителя чумы имеются в монографиях В. М. Туманского (1958), И. В. Домарадского (1966, 1971), И. Л. Мартиневского (1969), Pollitzer (1954), а также в ряде диссертаций, почти не доступных широкому кругу читателей.

Книга же Е. М. Губарева и Н. Н. Ивановского «Биохимия чумного микроба» даже в момент ее выхода в свет (1958) не отражала наших знаний и не была свободна от существенных недостатков.

Потребность в обобщении данных по биохимии и генетике чумного микроба особенно велика сейчас, когда все мы являемся свидетелями бурного развития молекулярной биологии.

Наличие общих закономерностей, свойственных живой природе, не освобождает от необходимости подобного обобщения. Ведь каждому живому существу, включая микроорганизмы, присуща своя специфика, суть которой можно познать только путем глубокого изучения их особенностей и сопоставления этих особенностей с общими закономерностями.

Надо подчеркнуть, что исследование путей обмена и генетики чумного микроба в значительной мере отстает от изучения аналогичных вопросов в отношении других микробов, особенно непатогенных или условно патогенных. Это объясняется главным образом двумя причинами.

Во-первых, такие микробы, как кишечная палочка, в силу доступности для любой лаборатории стали «референтными» моделями для выявления общих закономерностей.

Во-вторых, с патогенными возбудителями, в частности с Y. pestis, работать труднее из-за опасности лабораторных заражений и необходимости адаптации сложных современных методов к строгим условиям противоэпидемического режима.

В основе книги лежат данные, полученные научными сотрудниками противочумной системы нашей страны.

Кроме того, широко использованы результаты исследований зарубежных ученых. Иногда они так тесно переплетаются друг с другом, что трудно сказать, кто был пионером. И это не удивительно, поскольку преемственность — основная тенденция в современной науке, а идеи «носятся в воздухе».

Мы стремились к объективному изложению фактов, избегая домыслов и натяжек в тех случаях, когда фактов не хватало. Несмотря на значительные усилия, мы все еще далеки от того, чтобы заполнить брешь между микробиологией чумы, с одной стороны, и клиникой и эпидемиологией — с другой. Многое еще предстоит сделать, главным образом в области генетики Y. pestis. Именно поэтому раздел биохимии представлен гораздо полнее. Слабое освещение вопросов, касающихся физико-химических свойств возбудителя чумы (раздел написан по плану, предложенному Е. Э. Бахрах, которой авторы выражают искреннюю благодарность),— результат того, что они еще остаются для нас tabula rasa.

Еще одно замечание. В книге «Возбудители пастереллезов и близких к ним заболеваний» (1971) один из нас подчеркивал преждевременность каких бы то ни было изменений в систематике и номенклатуре пастерелл. Однако книга была сдана в печать еще осенью 1968 г. С тех пор в процессе интенсивного сравнитель-

ного изучения ряда микробов накопились многочисленные данные, в том числе и в лаборатории ее автора, подтверждающие целесообразность отнесения чумного микроба к новому роду — Yersinia.

Поэтому в настоящей книге с учетом рекомендации Подкомитета по Yersinia, Pasteurella, Francisella при Международном комитете по номенклатуре бактерий от 13 апреля 1972 г. возбудитель чумы именуется Yersinia pestis.

Глава I

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ

Yersinia pestis, как и любой другой микроорганизм, имеет определенный химический состав, который в сочетании с признаками, характерными для каждого микроба, обусловливает его видовую принадлежность.

Данные, позволяющие судить о химическом составе целых клеток Y. pestis, весьма немногочисленны, поскольку специально изучением этого вопроса почти не занимались. Сведения о некоторых химических компонентах Y. pestis, приводимые различными исследователями, отрывочны, иногда противоречивы. Получены они, как правило, в процессе выделения и изучения с целью практического использования отдельных фракций микроба (специфических комплексов), обладающих антигенными, иммуногенными, аллергенными и другими свойствами.

Каждый, кто попытается проанализировать современное состояние проблемы химического состава целых клеток, встретится с рядом трудностей. С одной стороны, следует учитывать значительный разброс результатов и те факторы, которые на него влияют. Возьмем, например, различия в методах анализа. Сплошь и рядом именно они определяют колебания данных по содержанию отдельных компонентов в клетках одного и того же штамма. Нельзя оставлять без внимания и то, что исследуемый материал выращивают в неодинаковых условиях. Так, например, не всегда возможно регулировать состав сложных питательных сред. Клетки поразному подготавливают к анализу (отмывают или не отмывают, обрабатывают ацетоном или лиофилизируют и т. д.).

С другой стороны, если со временем и удастся добиться стандартизации методик, условий выращивания клеток и подготовки их к опыту, на получаемые данные будут оказывать влияние многие другие факторы, ко-

торые не всегда удается устранить. Поэтому при анализе показателей химического состава трудно определить, являются ли расхождения в опытах различных исследователей следствием колебаний в самом химическом составе или они — результат погрешностей методов. Из изложенного не следует, однако, что мы отрицаем изменения непосредственно в химическом составе клеток. Они безусловно имеются и зависят, в частности, от происхождения штаммов, возраста клеток, темпов их роста и многих других факторов.

Таблица 1

Содержание отдельных компонентов клеток штамма EV при культивировании его на разных средах

Компоненты клеток	Агар Мартена	Агар Хоттингера			Бульон из кислотного гидролизата казеина	
					Nair с сотр. (1966)	
	В. Г. Акименко (1955)	М. Л. Беккер и А. З. Куцемакина (1960)	Е. Э. Бахрах с сотр. (1963, 1964, 1966)	И. А. Кузьмиченко (1967)	с аэрацией	без аэрации
Азот	11,28	13,84	12,44	12,90	12,0	13,5
Белки	—	—	76,61	—	56,0	56,0
Фосфор	1,13	—	1,54	1,36	—	—
Нуклеиновые кислоты:	—	14,83	11,86	8,18	—	—
РНК	—	12,90	8,56	5,35	11,5	13,5
ДНК	—	1,88	3,30	2,83	3,9	4,3
Полисахариды	5,31	—	2,31	3,54	9,8	7,4
Липиды:	—	—	3,10	3,80	—	—
свободные	6,75	—	1,26	2,00	—	—
связанные	—	—	1,82	1,80	—	—
Фосфор липидов	—	—	—	—	0,5	0,7

Первые попытки определить содержание в клетках Y. pestis отдельных химических компонентов относятся к 20—40-м годам. Среди них нужно отметить работы А. И. Быстренина (1940) и Н. Н. Ивановского (1944). В дальнейшем было проведено более обстоятельное изучение химического состава клеток различных штаммов, главным образом вакцинного штамма EV. Данные некоторых авторов представлены в табл. 1.

Так как большинство данных об органических веществах микробов получают путем анализа продуктов

гидролиза бактериальной массы, они отражают по существу лишь содержание фрагментов более сложных компонентов клетки, истинное же строение составляющих микроб веществ еще окончательно не выяснено.

Белки. Первые сведения о количестве белка в культуре Y. pestis встречаются в работе А. И. Быстренина (1940), определившего, что микроб в расчете на сухой вес содержит 84,1% белка по азоту. Н. Н. Ивановский (1944) справедливо полагает, что действительная величина должна быть ниже, так как нельзя весь азот считать белковым. Органические азотсодержащие соединения, входящие в состав бактериальных клеток, очень разнообразны: нуклеотиды, пептиды, аминосахара и прочие вещества, обладающие совсем другими свойствами и выполняющие иные функции, чем белки. Поэтому по результатам, полученным при определении общего азота, нельзя судить о природе и количестве азотсодержащих соединений каждого типа.

Н. Н. Ивановский исследовал по фракциям азотсодержащие (методом ван Слейка—Кавета) и фосфорсодержащие (методом Суббароу) вещества штамма Y. pestis, выращенного на агаре Хоттингера при pH 7,1 и 28° в течение 2 суток. Автор приводит следующие результаты анализа воздушно-сухого обезжиренного препарата: 13,32% общего азота, 0,73% азота гуминовых веществ, 0,83% аммиака, 7,44% моноаминокислот, 2,04% диаминокислот, 1,68% пуриновых и пиримидиновых оснований, 1,10% общего фосфора, 0,18% липидного фосфора (в необезжиренном препарате) и 0% неорганического. Следовательно, по расчетам Н. Н. Ивановского, Y. pestis содержит 72,15% белков и 11,11% нуклеиновых кислот, при этом в белках значительно больше азота моноаминокислот, чем диаминокислот (отношение 3,6 : 1).

К сожалению, приведенные А. И. Быстрениным и Н. Н. Ивановским данные весьма относительны. В настоящее время известно, что содержание белка (азота) в клетках разных штаммов Y. pestis не является величиной постоянной (В. Г. Акименко, 1955; Е. Э. Бахрах и др., 1966; В. А. Кротова, 1968), а А. И. Быстренин и Н. Н. Ивановский не указывают, с какими штаммами они работали. В дальнейшем количество общего азота и белка определяли в основном в клетках штамма EV (табл. 1).

Приведенные данные позволяют считать, что в клетках Y. pestis содержание белка существенно не отличается от такового в клетках других бактерий.

Несмотря на колебания в содержании общего азота в разных штаммах Y. pestis, аналогичных различий в аминокислотном составе обнаружено не было.

В. А. Кротовой (1958) с помощью хроматографии на бумаге в трех исследованных штаммах Y. pestis (№ 1, 17 и EV) были идентифицированы 16 аминокислот: аспарагиновая, глютаминовая, аргинин, лизин, серин, треонин, глицин, аланин, валин, лейцин, пролин, цистин (цистеин), фенилаланин, триптофан, метионин и гистидин. Остались неидентифицированными два вещества (а на отдельных хроматограммах — три), дающие слабоокрашенные относительно небольшие пятна розового цвета. Возможно, они являются полипептидами или аминокислотами, которые не были определены из-за отсутствия свидетелей, или продуктами их разложения, образующимися в процессе гидролиза.

И. А. Кузьмиченко (1967) установила, что аминокислотный состав бактерий с разной потребностью в кальции идентичен. В клетках штамма EV и его кальцийнезависимого варианта с помощью хроматографии выявлены цистин, лизин, гистидин, аргинин, серин, глицин, глютаминовая и аспарагиновая кислоты, треонин, аланин, пролин, тирозин, метионин, фенилаланин, валин и лейцин. Помимо того, с помощью специальной пробы был обнаружен триптофан. Отмеченные незначительные отличия в аминокислотном составе могли зависеть от питательной среды, степени аэрации, возраста культур и других факторов, о которых уже говорилось.

Влияние условий культивирования сказывается не только на общем количестве белка в клетках Y. pestis, но и на соотношении его растворимых и нерастворимых компонентов. Так, М. Л. Беккер и А. З. Куцемакина (1960) показали, что в вытяжках из клеток, выращенных в бульоне (при аэрации) или на агаре и обработанных последовательно различными экстрагентами, определяется неодинаковое количество общего азота (табл. 2).

Содержание растворимых белковых компонентов клетки в большой степени зависит и от температуры культивирования. Е. Э. Бахрах с сотр. (1964) и И. А. Кузьмиченко (1967) показали, что для тех кле-

Таблица 2

Содержание растворимых компонентов общего азота при различных условиях культивирования клеток штамма № 1 Y. pestis (по материалам М. Л. Беккера и А. З. Куцемакиной, 1960)

Экстрагент	Содержание (в %) общего азота в препаратах из клеток, выращенных	
	в бульоне при аэрации	на агаре
0,14М NaCl	27,7	25,8
1М NaCl	2,2	3,1
0,05М NaOH	30,6	46,9

Примечание. В остатке клеток содержалось соответственно 38,5 и 24,2% общего азота.

ток, которые образуют капсулу при 37°, характерна повышенная растворимость белков именно при этой температуре, а для клеток, лишенных этой способности,— при 28°. Поскольку на экстрагируемость веществ углеводной природы температура заметно не влияет, можно предположить, что у бескапсульных бактерий нарушается клеточная проницаемость, но избирательно для белков, или изменяется именно растворимость их компонентов. Качественный хроматографический анализ белковых и углеводных веществ, легко экстрагируемых солевым раствором из микробов с различной зависимостью от кальция, показал, что безотносительно к температуре выращивания из обеих субкультур Y. pestis экстрагируются белки и полисахариды, построенные соответственно из одних и тех же аминокислот и сахаров (И. А. Кузьмиченко, 1967).

Нуклеиновые кислоты. М. Л. Беккер (1965) определил, что в клетках Y. pestis количество нуклеиновых кислот уменьшается в процессе старения культуры. Изменение суммарного содержания нуклеиновых кислот происходит в основном за счет РНК. Так, количество РНК у 24-часовых культур штаммов EV и № 17 равнялось соответственно 21,4 и 24,9, а у 72-часовых культур — 14,2 и 18,9 мкг на 1 млрд. микробных клеток. Что касается ДНК, то, как правило, колебание количества ее наблюдается лишь в более ранние сроки выращивания Y. pestis. Однако иногда это происходит в поздних фазах роста. Отмеченные изменения содержания ДНК у Y. pestis могут быть связаны с тем, что культуры не являются гомогенными. В популяции их

содержатся особи, рост которых в определенных условиях отстает. Количество ДНК у подобных клеток может значительно меняться (увеличиваться и уменьшаться) лишь при переходе их в логарифмическую фазу, что отражается на содержании ДНК в «суммарной» культуре.

В нашей лаборатории В. И. Марченковым (1972) показано, что количество ДНК на одну микробную клетку Y. pestis (логарифмическая фаза развития) в популяции, выращенной на бульоне Хоттингера в стационарных условиях, составляет $0{,}827 \cdot 10^{-14}$ г.

Уменьшение содержания нуклеиновых кислот, опять-таки за счет РНК, отмечено также в процессе роста Y. pestis при 37°, который обычно хуже, чем при 28°, и сопровождается повышением питательных потребностей клеток (Е. Э. Бахрах и др., 1963; И. А. Кузьмиченко, 1967; Gadgil e. a., 1967b). Температура 37° является менее благоприятной и в отношении накопления растворимых полифосфорных соединений в клетке Y. pestis (З. Н. Попова, О. И. Полиевитова, 1970). Отмеченная зависимость, как правило, характерна и для других микроорганизмов (А. Е. Белозерский, А. С. Спирин, 1962, и др.). РНК является наиболее чувствительным элементом клетки, почти мгновенно реагирующим на изменения окружающих условий. Биологическая сущность этого явления понятна, так как с содержанием РНК связана скорость белкового синтеза.

М. Л. Беккер и А. З. Куцемакина (1960) не отметили достоверных различий между содержанием общего азота и нуклеиновых кислот в клетках Y. pestis, выросших на агаровых средах и в бульоне при аэрации: количество азота соответственно равнялось $13{,}84 \pm 0{,}31$ и $14{,}16 \pm 0{,}32\%$, содержание нуклеиновых кислот — $15{,}22 \pm 0{,}92$ и $16{,}27 \pm 0{,}78\%$. Однако более детальное исследование показало существенное влияние условий культивирования на растворимость ДНК в различных экстрагентах. Так, при последовательной обработке ими сухой бактериальной массы оказалось, что из клеток, выращенных на плотных агаровых средах, основная масса ДНК извлекается растворами хлористого натрия, а из клеток, полученных при глубинном выращивании,— раствором едкого натра. Эти различия особенно четко проявляются у штамма № 1 по сравнению со штаммом EV (табл. 3).

По мнению авторов, причин, определяющих степень экстрагируемости ДНК из бактериальных клеток, культивируемых на плотной среде и в бульоне при аэрации, может быть несколько:

Таблица 3

Растворимость ДНК клеток Y. pestis (в % к сухому весу) при различных условиях их культивирования (по материалам М. Л. Беккера и А. З. Куцемакиной, 1960)

Экстрагент	Содержание ДНК в препаратах из клеток штамма			
	№ 1		EV	
	агар	бульон	агар	бульон
0,14M NaCl	14,3	80,4	19,4	53,2
1M NaCl	4,3	11,5	2,4	4,8
0,05M NaOH	69,5	8,1	73,5	42,0

Примечание. В остатке клеток содержалось соответственно 12,2, 0, 4,7 и 0% ДНК.

1. Колебания проницаемости оболочки клеток для ДНК и дезоксирибонуклеопротеидов (более плотная клеточная оболочка у глубинных культур может быть мало проницаемой для таких высокомолекулярных соединений, как ДНК и ДНП).

2. Различия в активности ферментов, деполимеризующих ДНК клеток,— дезоксирибонуклеаз (в этом случае приходится предполагать, что ДНК-аза у бактерий, выращенных на агаре, более активна, чем у бактерий в условиях глубинного культивирования).

3. Характер комплексообразования белков с ДНК (по-видимому, более прочные комплексы ДНК с белками у глубинных культур не распадаются под влиянием растворов солей, как это имеет место у культур, полученных на агаре).

Состав ДНК в клетках Y. pestis подчиняется правилу Чаргаффа (отношение $\frac{Г + Т}{А + Ц}$ близко к единице). Показатель специфичности $\frac{А + Т}{Г + Ц}$ колеблется в относительно небольших пределах — 0,98—1,09 (И. В. Домарадский, 1971; В. И. Марченков, 1972). Приведен-

ные данные свидетельствуют о том, что ДНК у исследованных штаммов принадлежит к слабому АТ-типу, т. е. в ее составе несколько больше аденина и тимина, чем двух других азотистых оснований. Несколько иной коэффициент специфичности (0,91) в опытах Е. М. Губарева с сотр. (1964), по-видимому, объясняется особенностями методики.

По данным Р. С. Михайловой и М. Л. Беккера (1966), не наблюдается заметных различий в нуклеотидном составе ДНК штамма EV и вариантов, полученных под действием антисывороток к бактериям из семейства кишечных и отличающихся способностью ферментировать рамнозу, лактозу и глицерин, а также мочевину. Однако М. Л. Беккером (1965) отмечены небольшие, но статистически достоверные различия в соотношении оснований ДНК у штамов EV и № 1.

Сведения о коэффициенте специфичности РНК относятся только к штамму EV, но они противоречивы. Так, Е. М. Губарев с сотр. (1964) указывают, что РНК принадлежит к ГЦ-типу (отношение $\frac{Г + Ц}{А + У} = 1{,}16$), а опыты Р. А. Шахтарина (1966) свидетельствуют в пользу умеренного АУ-типа.

В составе ДНК восьми штаммов Y. pestis, в том числе и EV, обнаружен 6-метиламинопурин (В. И. Марченков, 1972). При расчете степени корреляции между нуклеотидным составом ДНК (Г+Ц) и содержанием 6-метиламинопурина получен коэффициент 0,167.

Аналогичные данные о штамме EV представлены также Б. Ф. Ванюшиным с сотр. (1970); кроме того, ими показано, что ДНК Y. pestis, как и других бактерий, обладает низкой степенью сблоченности.

Липиды. По данным А. И. Быстренина (1940), количество липидов составляет 3,7%. Он же определил некоторые физико-химические свойства этих компонентов Y. pestis: температуру плавления (40°), йодное число (27,7—29,6), число омыления (169—188).

Количество липидов, как и некоторых других компонентов, зависит от условий культивирования Y. pestis. А. И. Кузьмиченко (1967) и В. Д. Егоровой (1967) на штамме № 586 и его кальцийзависимом мутанте, штамме № 708 и его авирулентном мутанте показано увеличение количества липидов в клетках, выращенных при 37°, по сравнению с клетками, выращенными при 28°. Так,

количество общих липидов, выраженное в процентах к сухому весу клеток, было увеличено в 1,3—3 раза, количество свободных липидов — в 2—2,9 раза, количество связанных липидов — в 0,8—3 раза.

В составе липидов Y. pestis выявлены моно-, ди-, триглицериды, микрозиды, свободные жирные кислоты, лецитины, кефалины, коламин, серинфосфатид, неидентифицированный фосфатид, фосфатидные кислоты, метиловые эфиры жирных кислот; стерины и стериды отсутствовали (А. В. Мужиченко, 1966; Е. А. Бойкова, 1967; Е. К. Алимова, Е. А. Бойкова, 1967).

Среди жирных кислот свободных липидов Y. pestis обнаружено 8 насыщенных высших жирных кислот, 21 ненасыщенная и 2 разветвленных. Идентифицированы, в частности, пальмитиновая, пальмитолеиновая, миристиновая, каприновая, октадеценовая, гептадекаеновая и олеиновая кислоты. При исследовании связанных липидов были выявлены 4 насыщенные, 11 ненасыщенных и 3 разветвленные жирные кислоты.

Сравнительное изучение состава жирных кислот в свободных и связанных липидах показало не только качественные, но и количественные различия (Е. К. Алимова, Е. А. Бойкова, 1967). Если в свободных липидах количественно преобладали пальмитиновая (21—40%), гептадекаеновая (12—22%) и олеиновая (5—12%) жирные кислоты, то в связанных они соответственно составляли 2,4, 1,2 и 2,5%. Зато в связанных липидах обнаружено значительное количество $C_{13:0}$ разветвленной кислоты (18,9%), 6,9-гексадекадиеновой (15,9%) и нонадекадиеновой (16,3%).

Особенностью состава липидов клеток Y. pestis является наличие жирных кислот с циклопропановым кольцом, а также большого количества разветвленных и полиненасыщенных жирных кислот (Е. А. Бойкова, 1967).

Углеводы. Данные о количестве углеводных компонентов в клетках Y. pestis значительно разнятся (2,5—10%). Культивирование разных штаммов Y. pestis на плотных питательных средах при 37° часто сопровождается усиленным синтезом полисахаридных компонентов, чего не бывает при 28° (Е. Э. Бахрах и др., 1963; И. А. Кузьмиченко, 1967). В клетках штамма EV, выращенных на бульонных средах (в том числе аэрированных) при 28 и 37°, не было отмечено различий в со-

держании полисахаридных компонентов (Nair e. a., 1966). Изменение температуры выращивания, как уже указывалось, заметно не отражается на количестве экстрагируемых углеводных компонентов из бактериальной клетки (Е. Э. Бахрах и др., 1964; И. А. Кузьмиченко, 1967).

Изучение моносахаридного состава проводили как в целых клетках Y. pestis, так и в отдельных фракциях, выделенных из водно-солевого экстракта и остатка клеток после их экстрагирования. В результате установлен (А. В. Грибоедов, 1969, и др.) значительный набор моносахаридов, качественно не отличающийся в клетках, выросших при 28 и 37°. В. Д. Егоровой (1967) у штамма EV, выросшего при 37°, идентифицировано 10 соединений: галактоза, глюкозамин, глюкоза, ксилоза, рибоза, арабиноза, рамноза, манноза, альдогептоза, глюкуроновая кислота. Помимо того, на хроматограмме было отмечено два неидентифицированных пятна с большим и малым R_f. Соотношение первых восьми сахаров примерно следующее: 100 : 20 : 10 : 10 : 10 : 1 : 1 : 1. В клетках, выросших при 28°, отмечалось более низкое содержание галактозы и более высокое глюкозы.

Несомненно, что у Y. pestis, как и прочих бактерий, простые углеводы (моно- и дисахариды) и полиозиды играют особую роль в структуре клетки, ее обмене и в определении специфичности ряда антигенов.

В настоящее время у Y. pestis выявлено несколько полисахаридных компонентов, различающихся по прочности связи с клеточными структурами, набору моносахаридов и серологической специфичности. Seal (1951) выделил из клеток Y. pestis, продуцирующих капсулу, легко растворимый полисахарид, ассоциированный с поверхностными структурами клетки. В его составе была идентифицирована арабиноза.

Полисахаридный компонент липополисахарида клеток Y. pestis (Davies, 1956) содержит глюкозу, глюкозамин и D-глицеро-L-маногептозу. Он прочно связан с клеточными структурами и может быть выделен только после разрушения клеток ультразвуком, щелочью или фенолом (Е. Э. Бахрах, 1968)[1].

[1] По данным Н. Л. Лосевой с сотр. (1967), липополисахариды, полученные фенольной экстракцией, содержали до 6—7% азота, 4—5% фосфора, 10—28% нуклеиновых кислот, 35—37% углеводов, 4—8% белка и липиды.

2 Заказ № 6541

Бесспорный интерес представляет полисахарид «основного соматического антигена», экстрагированного из клеток Y. pestis трихлоруксусной кислотой (С. М. Дальвадянц, 1968; Е. Э. Бахрах, В. И. Вейнблат, 1970). По данным Е. Э. Бахрах и Т. М. Тараненко (1968), полисахаридный компонент основного соматического антигена из глюкозы и глюкозамина.

А. В. Грибоедов (1969) показал, что в водно-солевом экстракте и остатке клеток штамма EV содержится несколько полисахаридов и полисахаридсодержащих веществ. Автору удалось из фракции, полученной при 66—100% насыщении сернокислым аммонием, выделить полисахарид А, серологически не идентичный препаратам, описанным выше. В полисахариде А были обнаружены галактоза, глюкоза, манноза, фруктоза, ксилоза, а также три неидентифицированных компонента.

Минеральные вещества. В клетках Y. pestis их никто не исследовал. Известно лишь, что количество золы в высушенных ацетоном клетках составляет 4—6% (В. Д. Егорова, 1967; И. А. Кузьмиченко, 1967). Описанные компоненты бактериальных клеток — белки, нуклеопротеиды, липиды, полисахариды и др.— распределены по морфологическим структурам в разных соотношениях. Однако с такой стороны Y. pestis по существу изучена недостаточно. Можно сослаться лишь на

Таблица 4

Химический состав клеток Y. pestis и их оболочек (по Е. П. Ефимцевой, 1968)

Препараты	Содержание в % к сухому весу					
	азота	белка	фосфора	нуклеиновых кислот	редуцирующих веществ	гексозамина
Целые клетки	9,25	58,70	1,54	6,75	7,68	—
Оболочки	4,48	29,74	1,01	0,018	18,30	2,21

данные Е. П. Ефимцевой (1968) по определению некоторых химических показателей клеток штамма EV и выделенных из них оболочек (табл. 4).

Авторы идентифицировали в клеточной оболочке Y. pestis 11 аминокислот: лизин, аргинин, аспарагино-

вую кислоту, глицин, глютаминовую кислоту, треонин, аланин, тирозин, фенилаланин, лейцин, изолейцин — и следующие моносахара: гексозамин, галактозу, следы глюкозы, арабинозы и рамнозу.

В клеточных стенках Y. pestis 8,4% липидов (на сухой вес), в составе которых обнаружены фосфолипиды и жирные кислоты, содержащие 10 углеродных атомов (А. В. Мужиченко, 1966). Липиды, извлеченные из стенки, связаны с глюкопептидом, однако связь эта непрочна.

В нашей лаборатории при исследовании химического состава мембранных структур клеток Y. pestis показано, что 64% их сухого веса приходится на белки, 19% составляют липиды, 5,8% — углеводы и 1,8% — нуклеиновые кислоты (Е. П. Голубинский и др., 1971а). Свободно экстрагируемые липиды мембран характеризуются высоким содержанием неэстерифицированных жирных кислот — 38,1%. На долю фосфолипидов в них приходится 37,3%. Основными компонентами фосфолипидов являются фосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин и фосфатидилхолин. В меньшем количестве присутствуют инозинфосфатиды, фосфатидные кислоты, фосфадилглицерин и другие фракции. В составе белка мембранных образований обнаружено 10 аминокислот (Е. П. Голубинский и др., 1973а).

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

В обычных условиях культивирования клетки Y. pestis обладают отрицательным зарядом. У клеток, выросших при 30° и pH 7,0, электрофоретическая подвижность соответствует 0,91 мк/сек/В/см. При pH 6,7 и температуре около 37° она снижается, что свидетельствует об изменении поверхностного заряда (Aronson, Bichowsky-Slomnicki, 1960). Позже выяснилось, что это явление связано с образованием так называемого pH-6-антигена (Ben-Efraim e. a., 1961).

Изоэлектрическая точка клеток Y. pestis (Е. М. Губарев и Н. Н. Ивановский, 1958) лежит в интервале pH 4,0—4,4, т. е. в зоне, характерной для грамотрицательных микробов (изоэлектрические точки грамотрицательных клеток группируются около pH 5,0, а грамположительных — около pH 2).

Клетки Y. pestis грамотрицательны, однако, по данным Е. М. Губарева и Н. Н. Ивановского (1958), в молодых культурах они нередко слабо окрашиваются по Граму. Авторы объясняют это тем, что молодые клетки более электроотрицательны, чем взрослые, и изоэлектрическая точка их протоплазмы смещена в кислую сторону по сравнению со старыми. Высокое содержание нуклеиновых кислот, свойственное молодым растущим клеткам, вероятно, объясняет их большую способность связывать основные краски, т. е. их повышенную базофилию.

Работы Е. И. Коробковой (1929) и др. показали, что рост Y. pestis в среде сопровождается восстановлением ее компонентов. По данным Е. Э. Бахрах и В. С. Башевой (1951), на бульоне Мартена при 37° клетки Y. pestis в первые 4 суток роста снижают окислительно-восстановительный потенциал (rH_2) с 25—28 до 8—11. Этому соответствует снижение pH среды и увеличение количества живых клеток в исследуемой культуре. В дальнейшем окислительно-восстановительный потенциал продолжает держаться на низком уровне (rH_2 7,6—12,0) и лишь на 45-е сутки поднимается почти до значения потенциала стерильной среды. Согласно результатам опытов Ф. К. Дроздовской с сотр. (1966), в стационарных условиях и при аэрации начало логарифмической фазы роста клеток Y. pestis совпадает с максимальным снижением потенциала среды. В течение логарифмической фазы развития уровень Eh изменяется незначительно, в стационарной фазе принимает постоянное значение и резко повышается в процессе лизиса клеток как в бульоне без аэрации, так и при аэрации.

Другими сведениями по затронутым вопросам мы не располагаем.

Питание

Y. pestis, как и все живые организмы, нуждается в поступлении в клетку разнообразных химических веществ, являющихся для нее источником энергии и пластическим материалом. Поступление питательных веществ в цитоплазму, если Y. pestis не представляет исключения из общего правила, может осуществляться через всю поверхность клетки и должно быть связано с диффузией питательных веществ, а также с действием

специальных транспортных систем. К сожалению, эти вопросы до сих пор никем не изучались.

Проблеме питания Y. pestis посвящено большое количество работ, и во всех без исключения микроб характеризуется как типичный гетеротроф. Способность Y. pestis фиксировать CO_2 (Boyce e. a., 1964; Baugh e. a., 1964a) не противоречит сказанному, поскольку в отсутствии органических веществ она не может обеспечивать клетку углеродом и энергией. Органические субстраты используются Y. pestis лишь в тех случаях, когда они присутствуют в среде в определенной, легкоусваиваемой форме; полимерные питательные вещества обычно не потребляются, и только некоторые из них, по-видимому, могут ассимилироваться после внешнего переваривания. Зависимость интенсивности роста Y. pestis от степени расщепления питательных веществ показана, в частности, на примере белков (Е. Э. Бахрах и др., 1951, и др.). Возможность же гидролиза полимерных субстратов установлена лишь в отношении нуклеиновых кислот и отдельных полисахаридов (гликоген, декстрин), однако их роль в питании Y. pestis полностью не вскрыта (Woodward, 1944; Е. П. Голубинский, 1965; В. Г. Майский, 1968; И. В. Домарадский, 1971).

Источником углерода и энергии для Y. pestis в основном служат окисляемые ею вещества. К их числу в первую очередь относится глюкоза. Глюкоза легко ферментируется при росте микроба. Скорость ее утилизации в покоящихся культурах и интенсивность потребления кислорода при этом превышают аналогичные показатели при распаде подавляющего большинства других веществ (Rao, 1940b; Santer, Ajl, 1954, 1955a и b). Об эффективности использования глюкозы Y. pestis можно судить хотя бы по результатам опытов Boyce с сотр. (1964). За 24 часа роста в жидкой среде при встряхивании в состав клеток включалось от 23 до 30% углерода (в зависимости от того, присутствовала ли 1-C^{14}- или 6-C^{14}-глюкоза). Наибольшей радиоактивностью отличалась фракция липидов, несколько меньшей — белков и нуклеиновых кислот. «Выход» CO_2 равнялся 25% в случае 1-C^{14}-глюкозы и 4% в случае 6-C^{14}-глюкозы. Именно поэтому в синтетические среды для культивирования Y. pestis в качестве основного или единственного источника углерода и энергии обычно рекомендуют вводить глюкозу. Ее же используют и в вакцинном

производстве, несмотря на то, что бактерии выращивают на средах, богатых органическими веществами (Ф. К. Дроздовская и др., 1962, и др.).

Необходимо указать, что глюкоза, как, впрочем, и другие углеводы, полнее утилизируется живыми существами в аэробных условиях. Еще одним подтверждением общего правила могут служить данные Englesberg с сотр. (1954), согласно которым в присутствии кислорода Y. pestis усваивает 58% углерода глюкозы, а при анаэробиозе — 39%. Очевидно, это связано с образованием в первом случае большего «ассортимента» метаболитов, в том числе и менее восстановленных по сравнению с лактатом или этанолом — основными продуктами гликолиза (см. раздел «Метаболизм»).

Применяя глюкозу для конструирования питательных сред, нельзя забывать, однако, о ее отрицательных свойствах. При определенных условиях глюкоза оказывает токсическое действие на вирулентные штаммы Y. pestis. Кроме того, при 37° и недостатке магния в среде токсическое действие на вирулентные клетки оказывает не только глюкоза, но и арабиноза, фруктоза, манноза, глюконат и некоторые другие соединения (Brubaker, Surgalla, 1964). Известно также, что у многих бактерий, включая Y. pestis, глюкоза нередко угнетает синтез ряда ферментов и замедляет скорость некоторых реакций (И. В. Домарадский, 1955, и др.). Кроме того, при распаде глюкозы в питательной среде накапливается большое количество кислых продуктов, которые изменяют pH среды и ее окислительно-восстановительный потенциал. Учитывая последнее обстоятельство, некоторые исследователи рекомендуют добавлять глюкозу к среде дробно, на протяжении всего периода роста культур Y. pestis (Ф. К. Дроздовская и др., 1962; Higuchi, Carlin, 1957). По данным Н. К. Муравьевой с сотр. (1966), при таком способе добавления глюкозы к гидролизату казеина для подкормки вакцинного штамма EV в реакторе выход микробной массы составлял 34—40 млрд. клеток в 1 мл вместо 9 млрд. в контрольной среде. Интересно, что добавление глюкозы наиболее эффективно в логарифмической фазе роста.

Помимо глюкозы, источниками углерода и энергии для Y. pestis могут быть ксилоза и маннит (Higuchi, Carlin, 1957). Применение этих веществ подчас более выгодно, так как при их диссимиляции не происходит

резких изменений реакции среды (для практических целей предпочитают использовать ксилозу).

Важный, на наш взгляд, вывод следует из работы Ф. К. Дроздовской с сотр. (1962): добавление глюкозы, глюконата и цитрата к аэрируемым культурам Y. pestis приводит к большему выходу клеток, чем применение каждого из них в отдельности.

Источником энергии и углерода для прототрофных штаммов Y. pestis (EV и № 17) служит также рибоза (Е. П. Голубинский, И. М. Буравченко, 1967). Нам не удалось найти других сведений об использовании рибозы; известно лишь, что этот углевод окисляется слабее гексоз (Santer, Ajl, 1955a; Mortlock, 1962).

Результаты исследования И. В. Домарадского с сотр. (1968а) показали способность штаммов, ферментирующих глицерин, развиваться на синтетических средах, где единственными источниками энергии и углерода служили соответственно глицерин, глицерофосфат и 3-фосфоглицериновая кислота. В отличие от этого глицеринногативные штаммы росли только в присутствии фосфоглицериновой кислоты. В дальнейшем было выявлено, что 1-C^{14}-глицерин используется континентальным штаммом № 17 для синтеза липидов, аминокислот и углеводов, в то время как у океанического штамма EV, который включает значительно меньше радиоактивного углерода, метка обнаруживается только в липидах (Е. П. Голубинский и др., 1972).

Ответ на вопрос о других источниках углерода для Y. pestis также был получен в основном с помощью изотопного метода.

Уксусная кислота и глицин утилизируются Y. pestis для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот, (И. В. Домарадский, А. Ф. Семенушкина, 1957, 1958). Следует отметить, что удельная радиоактивность указанных компонентов клетки зависит от концентрации меченого субстрата в среде.

Факт ассимиляции уксусной кислоты согласуется с данными о функционировании в клетках Y. pestis цикла трикарбоновых кислот, являющегося важнейшим источником энергии при окислении органических веществ. Наличие этого окислительного механизма позволяет считать, что любое из веществ, входящих в цикл, может в свою очередь служить для Y. pestis строительным и энергетическим материалом. В подтверждение

можно привести результаты опытов Воусе с сотр. (1964) об ассимиляции сукцината и фумарата и данные недавно начатого исследования Е. П. Голубинского и Г. Н. Воскобойниковой об использовании Y. pestis солей яблочной, янтарной и молочной кислот (не опубликовано). Как показали первые наблюдения, наибольший молярный коэффициент роста в условиях искусственной аэрации на жидкой синтетической среде обусловливает малат, далее следует сукцинат и лактат[1].

В. Г. Майский (1967б) показал включение углерода муравьиной кислоты в состав аденина и гуанина нуклеиновых кислот Y. pestis. На интенсивность внедрения метки, помимо концентрации муравьиной кислоты, влиял состав питательной среды. В синтетической среде процент использования радиоактивного субстрата намного выше, чем в бульоне Хоттингера. Вместе с тем в качестве источника энергии или углерода для синтеза других веществ, кроме адениловых и гуаниловых нуклеотидов, пуриновые основания не используются (Е. П. Голубинский, И. М. Буравченко, 1967).

Включение в различные компоненты клетки углерода радиоактивной галактозы и арабинозы установлено Воусе с сотр. (1964). При одинаковых условиях культивирования штамма EV Y. pestis сильнее утилизировался углерод 1-C^{14}-арабинозы (48,6% от исходного содержания в питательной среде) и слабее — углерод 1-C^{14}-галактозы (26%).

Таким образом, источником углерода и энергии для Y. pestis может служить довольно широкий круг органических веществ. В настоящее время, однако, трудно сделать обоснованный вывод об энергетической ценности и соответствующем месте каждого из них в питании Y. pestis, тем более что в литературе практически отсутствуют сведения о сравнительных исследованиях выхода энергии при применении того или иного питательного вещества.

Несомненный теоретический и практический интерес представляет отношение Y. pestis к источникам азота. Как известно, современная классификация подразделяет микроорганизмы по азотному питанию на аминоав-

---

[1] Интересно, что существенных различий в значении перечисленных субстратов для роста вакцинного штамма EV и высоковирулентного штамма № 1300 установить не удалось.

тотрофы и аминогетеротрофы. Из-за отсутствия протеолитической активности рост культур Y. pestis на мясопептонных средах, как уже говорилось выше, зависит от степени расщепления белков и накопления в среде аминного азота. Тем не менее сам по себе этот факт не является свидетельством потребности Y. pestis в большинстве природных аминокислот и не исключает возможности использования наряду с последними других источников азота.

В настоящее время накоплен большой фактический материал о поведении Y. pestis на средах известного химического состава. Именно эти работы вместе с данными об обмене аминокислот можно положить в основу наших знаний об азотном питании Y. pestis.

Первые исследования были предприняты Rao в 1939 г. (см. И. Л. Мартиневский, 1969). Выясняя значение отдельных аминокислот для роста шести вирулентных и четырех авирулентных штаммов на синтетической среде, содержащей пролин, аланин, лейцин, глицин, фенилаланин, лизин, аргинин и цистин, автор пришел к выводу, что незаменимыми аминокислотами являются только три — фенилаланин, цистин и пролин, в то время как глицин относится к числу дополнительных факторов роста, оказывающих существенное влияние на развитие клеток [1].

Doudoroff (1943) при изучении четырех штаммов Y. pestis подтвердил сведения Rao в отношении фенилаланина и цистина. Пролин в его опытах оказался не обязательным. Важно, что среда Дудорова содержала хлористый аммоний, в котором, как считает автор, нуждается Y. pestis.

На основании опытов с тремя вирулентными и двумя авирулентными штаммами Y. pestis Herbert (1949) все испытанные аминокислоты по их значению для роста разделил на четыре группы: 1) не оказывающие влияния — глицин, аланин, глютаминовая и аспарагиновая кислоты, норлейцин, лизин, пролин, оксипролин, тирозин и триптофан, 2) стимулирующие — серин, метионин и аргинин, 3) существенные — гистидин и треонин и 4) незаменимые — фенилаланин, цистин, лейцин, изо-

[1] Сконструированная Rao полусинтетическая среда, как и среды Rockenmacher с сотр. (1952) и др., не нашла применения при изучении питания Y. pestis, поскольку роль отдельных компонентов в ней трудно определить.

лейцин и валин. Интересно, что автор не смог добиться развития своих штаммов на среде, состоящей только из аминокислот четвертой группы. Не удалось ему это и на средах Rao и Doudoroff. По нашему мнению, такое обстоятельство в известной мере могло быть обусловлено применением Herbert небольших посевных доз культур при отсутствии в его среде каких-либо восстановителей.

Немалый вклад в изучение азотного питания Y. pestis внесли советские ученые. И. В. Домарадский и В. А. Иванов (1957) установили, в частности, что 20 авирулентных и вирулентных штаммов можно выращивать на синтетической среде при исключении из ее первоначального состава (17 аминокислот) моноаминодикарбоновых или диаминомонокарбоновых кислот, оксиаминокислот, триптофана и пролина, а также на средах без гликокола, аланина, валина и норлейцина. Без цистина и метионина культивирование Y. pestis не удавалось. Иная картина отмечалась в присутствии метионина — Y. pestis росла не хуже, чем в исходной синтетической среде. Замена же метионина цистином не всегда достигала цели. В работе впервые обращено внимание на неодинаковые потребности в аминокислотах континентальных и океанических штаммов (последние нуждались в тирозине). В конечном итоге И. В. Домарадский и В. А. Иванов пришли к выводу о возможности успешного культивирования континентальных штаммов Y. pestis на средах, содержащих лишь фенилаланин, цистин, метионин, серин, треонин, пролин и триптофан.

В дальнейших своих исследованиях И. В. Домарадский с сотр. (1958а) показали, что некоторые штаммы, правда, при условии посева большого числа клеток и добавлении 0,01% крови, способны расти на глюкозоминеральной среде в присутствии фенилаланина (5 мг%), цистина (10 мг%) и глицина (20 мг%).

Культивирование Y. pestis на синтетических средах не сопровождается снижением ее вирулентности и иммуногенности. В. А. Иванов (1959) показал, что среда, содержащая восемь аминокислот (фенилаланин, тирозин, цистин, метионин, серин, треонин, триптофан и пролин), может с успехом использоваться для сохранения вирулентности и иммуногенности штаммов Y. pestis.

Имеются данные о неодинаковой скорости поглощения отдельных аминокислот в процессе роста Y. pestis. Так, при культивировании в реакторах вакцинного штамма EV первыми из среды исчезают глютаминовая кислота и серин, затем снижается содержание треонина и пролина (Н. З. Трофименко и др., 1958). С исчезновением глютаминовой кислоты в культуре уменьшается количество живых клеток.

Небезынтересно, что некоторые аминокислоты, необходимые для роста Y. pestis, заменимы ди- и трипептидами, содержащими в своем составе L-формы этих соединений (И. Л. Мартиневский, 1969; Smith, Higuchi, 1959).

Помимо аминокислот и некоторых пептидов, источником азота может служить цитозин, дезаминируемый Y. pestis (Е. П. Голубинский, И. М. Буравченко, 1967). В этом случае мы сталкиваемся с использованием Y. pestis аммиака, который для прототрофных штаммов является единственным (Ю. Г. Сучков и др., 1967; И. Л. Мартиневский, 1969; Doudoroff, 1943), а для «диких» океанических — весьма существенным (Ю. Г. Сучков, 1969) источником азота[1]. Значение аммиака для питания особенно наглядно показывают такие примеры: наличие его в среде может существенно влиять на потребность в тех или иных аминокислотах; увеличение концентрации аминокислот в среде не компенсирует потребности океанических штаммов в неорганическом азоте[2].

Имеются сведения об использовании штаммами Y. pestis азота мочевины (Brubaker, Sulen, 1971).

Говоря об азотном питании, уместно задать вопрос, служат ли аминокислоты только «донорами» азота или утилизируются так же, как источник углерода и энергии. На этот вопрос, по-видимому, надо ответить положительно, хотя аминокислоты не могут полностью заменить углеводы (И. В. Домарадский, 1955; Doudoroff, 1943). В чем основная причина незаменимости отдельных аминокислот, сейчас сказать трудно. Дело в том, что все они легко дезаминируются прямым или

[1] В отличие от океанических штаммов глицериннегативные мутанты континентальных штаммов обходятся без неорганического азота.

[2] Хотя Y. pestis нередко редуцирует нитраты, они не используются в качестве источника азота (Doudoroff, 1943).

непрямым путем (см. раздел «Метаболизм»). Следовательно, можно допустить, что их роль сводится к обеспечению клеток не столько азотом, сколько углеродным скелетом, причем такой конфигурации, которую самостоятельно они воспроизвести не в состоянии. К сожалению, экспериментальными данными для проверки указанной гипотезы мы не располагаем.

Как видно из представленного материала, Y. pestis относится к числу аминогетеротрофов. Однако степень зависимости различных штаммов этого вида бактерий от аминокислот выражена неодинаково. На сегодня установлены две причины, обусловливающие характер зависимости.

Потребность в источниках азота в известной мере определяется происхождением штаммов. Впервые это было замечено И. В. Домарадским (1955), а затем подтверждено И. Л. Мартиневским (1969), Ю. Г. Сучковым (1969), И. Л. Мартиневским и В. М. Степановым (1972) и др. Не исключено, что в данном случае основное значение имеет не географическая область, а вид грызуна, из организма которого выделяют микроб.

Различия между штаммами во многом связаны также с постоянным наличием в популяции клеток тех или иных биохимических мутантов. Число их обычно не столь уж велико, но может сильно увеличиваться под влиянием неблагоприятных воздействий на культуры. Присутствие таких мутантов в популяции клеток Y. pestis доказано Doudoroff (1943), Englesberg (1952), И. Л. Мартиневским (1969), Ю. Г. Сучковым с сотр. (1967) и др. Ряд условий способствует селекции соответствующих мутантов, в результате чего культуры в целом становятся подчас прихотливее в отношении источников азота или, наоборот, начинают довольствоваться единичными аминокислотами и даже обходиться без них («адаптация»).

Все изложенное не позволяет рассчитывать на определение «истинной» аминограммы Y. pestis и в то же время объясняет, почему столь противоречивы результаты различных авторов. Тем не менее некоторые обобщения все же возможны: к эссенциальным аминокислотам для диких штаммов следует относить фенилаланин, метионин и во многих случаях цистеин (или цистин), треонин и изолейцин; другие аминокислоты не играют такой важной роли, хотя они безусловно вклю-

чаются в общий метаболический фонд и ассимилируются клеткой.

Не следует забывать, что экзогенные аминокислоты в определенных условиях могут оказывать отрицательное влияние на интенсивность обмена веществ вообще и тем самым на скорость размножения и свойства микробной культуры. В. М. Степанов (1969), исследуя развитие исходного штамма Y. pestis и его глицин- и аргининзависимых мутантов, определил, что аминокислоты, которые для этих штаммов не являлись незаменимыми, оказывали самое разнообразное действие на их рост. Одни из них, стимулируя развитие культуры в первых стадиях, затем задерживали его, другие наоборот. Выраженное ингибирующее влияние оказывали глицин, серин, валин и норвалин при концентрации более 1 мкг/мл среды. Интересно, что исследуемые варианты Y. pestis неодинаково реагировали на присутствие тех или иных аминокислот.

Некоторые аминокислоты влияют на морфологию колоний. И. В. Домарадский (1955) отметил образование выраженной периферической зоны у колоний Y. pestis при росте на среде с цистином и особенно с триптофаном. Аналогичные явления наблюдаются на синтетических средах в присутствии тирозина. Влияние на морфологию клеток гликокола описано Е. И. Коробковой (1960). Как было установлено позднее, оно не вызывается предшественниками этой аминокислоты (В. И. Вейнблат, 1970).

Роли витаминов в питании Y. pestis посвящен ряд работ. Как впервые установил Rao (1940b), при 27° Y. pestis может расти на средах, не содержащих витаминов. Однако, по его данным, некоторые витамины, не являясь необходимыми, так или иначе влияют на развитие клеток. Например, стимулирующее действие на рост оказывают козимаза, тиамин и никотиновая кислота, а флавин в сочетании с другими витаминами даже тормозит размножение микроба. Интересно, что козимаза и гематин в отличие от никотиновой кислоты и тиамина повышали эндогенное дыхание исследованных культур.

В опытах Doudoroff (1943) при 29° п-аминобензойная, никотиновая, пантотеновая кислоты, биотин, тиамин, рибофлавин, пиридоксамин и гематин не оказывали заметного влияния на рост Y. pestis. Rockenmacher с сотр. (1952), используя значительно больший набор

витаминов (биотин, рибофлавин, пиридоксин, холин, пантотенат кальция, фолиевая и п-аминобензойная кислоты, никотинамид, тиамин), получили аналогичные результаты. Позднее Richaud и Brygoo (1970) наблюдали торможение роста Y. pestis в присутствии фолиевой кислоты. Возможно, это связано с неэквивалентным количеством витамина, добавленного к среде.

Таким образом, большинство штаммов Y. pestis при 28° обходится без витаминов. Исключение составляют штаммы, выделенные от полевок в Закавказском нагорье, которые и при данной температуре, помимо некоторых аминокислот, нуждаются в тиамине (Л. Н. Классовский и др., 1972).

При 37°, как установили Hills и Spurr (1952), эти вещества становятся необходимыми для полноценного роста. Так, применение пантотената кальция и биотина позволило исключить 12 из 20 аминокислот, входящих в среду Herbert (1949). Значительное улучшение развития культур Y. pestis при 36° на синтетической среде, содержащей 13 аминокислот, в присутствии биотина, тиамина и пантотеновой кислоты наблюдали Higuchi и Carlin (1958). Никотинамид в их опытах не обусловливал подобного действия. Исследуя питание Y. pestis при температурных условиях, характерных для организмов животных — носителей чумы, Brownlow и Wessman (1960) пришли к выводу, что при 36° и выше для роста взятых ими четырех штаммов требуется биотин, при 37° — пантотеновая кислота или тиамин, при 38° — все три витамина (в своей работе Brownlow и Wessman использовали синтетическую среду, содержащую, помимо глюкозы, шесть аминокислот: фенилаланин, метионин, цистеин, изолейцин, валин и треонин). Сходные данные о наборе витаминов, необходимых Y. pestis, и повышении ее аминокислотных потребностей при 37° представлены в работах Burrows и Gillett (1966), В. И. Вейнблат и сотр. (1972).

Многие исследователи считают, что важную роль в жизнедеятельности Y. pestis играют гематин и его производное — гемин (Rao, 1940b; Hills, Spurr, 1952; Higuchi, Carlin, 1958; Brownlow, Wessman, 1960; Burrows, Gillett, 1966). Из всех изученных Rao (1940b) факторов роста наибольшей стимулирующей развитие Y. pestis активностью обладал гематин. Эффективность гематина возрастала при его использовании совместно с никоти-

новой кислотой и тиамином. Гематин увеличивал и дыхательную активность бактериальных клеток, однако по силе этого действия он уступал никотиновой кислоте и тиамину.

Являясь составной частью гемопротеидов, гемин оказывает благоприятное действие на аэробный рост многих микроорганизмов. Механизм этого явления связан, по-видимому, с увеличением интенсивности энергетического обмена за счет участия гемина в образовании цитохромов дыхательной цепи клетки, а также с синтезом каталазы, разрушающей образующуюся при аэробном развитии токсическую для бактерий перекись водорода.

Аналогичное гемину стимулирующее действие на рост Y. pestis в некоторых условиях могут оказывать вещества, участвующие в синтезе порфирина: α-кетоглютаровая и в меньшей мере глютаминовая кислоты. Эти соединения, по данным Brownlow и Wessman (1960), возмещали потребность Y. pestis в гемине при 37° культивирования. Уместно напомнить о накоплении пигмента колониями вирулентных и некоторых авирулентных штаммов на среде с гемином.

Говоря о факторах роста, нельзя оставить без внимания стимулирующее влияние на Y. pestis некоторых веществ микробного происхождения, например лизатов отдельных видов сарцин. По данным К. С. Карпузиди и Л. Н. Макаровской (1956), эти лизаты значительно снижают посевную дозу и ускоряют темпы развития микробных культур. Установлено, что фракция, полученная путем обработки лизата сарцинной «кормилки» сначала сульфатом аммония, а затем ацетоном, не теряет активности до разведения $1:10^9$.

Улучшение роста Y. pestis при добавлении к средам 0,1% дрожжевого экстракта установлено Rockenmacher с сотр. (1952). Нами неоднократно наблюдалось подобное явление на синтетических средах, при этом морфология колоний оставалась характерной для Y. pestis.

Способностью улучшать качество казеиновых питательных сред, применяемых для выращивания Y. pestis, обладают также фильтраты культур кишечной палочки, протея, некоторых спороносных микробов и даже самой Y. pestis (И. Л. Мартиневский, 1969).

Пока трудно судить, с какими компонентами бактериальных экстрактов и лизатов связана их биологиче-

ская активность. По-видимому, не последняя роль в этом отношении принадлежит отдельным метаболитам и факторам роста, присутствующим в такого рода препаратах.

В известной мере «подкормкой» можно объяснить и стимулирующий эффект на рост Y. pestis некоторых веществ животного и растительного происхождения (И. Л. Мартиневский, 1969; Л. А. Тимофеева, В. Я. Головачева, 1969), в частности крови. По мнению Rao (1940b), какие-то компоненты крови участвуют в синтезе дыхательных ферментов. Не исключено, впрочем, что они используются Y. pestis как источники энергии, азота и углерода.

Для нормального развития микроорганизмам необходимы так называемые зольные элементы. Потребность бактерий в минеральных веществах очень незначительна. Y. pestis в этом отношении не является исключением. К числу необходимых ей элементов относятся сера, фосфор, калий, кальций, железо, магний, а также микроэлементы — ванадий, марганец, молибден, никель, цинк, йод, бром и др. Многие из перечисленных веществ входят в состав важнейших органических соединений бактериальной протоплазмы, другие необходимы для стабилизации коллоидов клетки и осуществления ферментативных реакций.

Источниками большинства зольных элементов для Y. pestis могут служить соответствующие соли соляной, серной, ортофосфорной, азотной, угольной и других кислот. Кроме этого, Y. pestis способна использовать также серу, фосфор, железо и другие элементы, содержащиеся в органических веществах.

По материалам И. В. Домарадского (1957), например, сера цистина используется Y. pestis для образования метионина.

Действие минеральных веществ на Y. pestis не всегда, однако, благоприятно. Важно, какие соли и в каких концентрациях применяют; небезразличен также исходный состав питательной среды. Сравнивая влияние хлористых солей, Е. Губарев и Т. Липатова (1930) отметили, например, вредное влияние относительно высоких концентраций (более 8,3 ммоля) в бульоне Мартена NaCl, KCl и $CuCl_2$ на развитие одного из музейных штаммов при 28°. Выраженными ингибиторами, даже при содержании в среде менее 8,3 ммоля, являлись

$CaCl_2$, $SrCl_2$ и NaI. Благоприятное действие на рост оказывали NH_4^+, Ba^{++} и Mn^{++}, первый начиная со значительной концентрации (16,6 ммоля), второй — при содержании 1,66 ммоля, третий — 8,3 ммоля и ниже. Попутно авторы отметили резко выраженное ингибирующее действие I′ даже при их незначительной концентрации и противоположное действие SO_4''.

Имеются данные (Ф. К. Дроздовская и др., 1962) о неодинаковом влиянии некоторых минеральных веществ на рост Y. pestis в зависимости от наличия в среде глюкозы. Так, в ее отсутствие деминерализация казеинового бульона с помощью едкого бария не отражается на величине микробного урожая. Напротив, на деминерализованной среде с глюкозой различные соли (K_2HPO_4, $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$) значительно улучшают рост Y. pestis. Стимулирующую роль фосфата в указанных условиях авторы объясняют увеличением буферной емкости среды и его участием в обмене микроба; механизм действия остальных солей, к сожалению, не обсуждается.

Л. И. Терентьева (1971) наблюдала стимуляцию роста вирулентного и авирулентного штаммов Y. pestis на синтетической среде в присутствии $MgSO_4$ (200—400 мг/л) и сернокислой соли закисного железа (60 мг/л). Автор считает целесообразным при приготовлении буферной основы синтетических сред применять фосфорнокислые натриевые соли в концентрации M/15. По ее данным, из соединений серы сульфат, сульфит и тиосульфат увеличивали урожай бактерий. Введение в среду сернистого натрия полностью подавляло рост культуры.

Неорганические компоненты среды существенно изменяют пигментацию колоний Y. pestis на средах с гемином. В связи с этим нужно учитывать соотношение Na/K в питательной среде. Магний и железо также оказывают влияние на пигментацию колоний.

Присутствие минеральных веществ изменяет и ферментативную активность бактерий (М. А. Тюлембаев, Б. М. Сулейменов, 1969). Например, хлористый натрий в 5—10% концентрации, не влияя на выживаемость микробных клеток, нарушает их способность ферментировать некоторые углеводы.

Весьма важное значение в питании Y. pestis имеет железо. Higuchi и Carlin (1957) наблюдали значитель-

ное улучшение роста культур Y. pestis на казеиновой среде при добавлении к ней от $2,5 \cdot 10^{-5}$ до $5 \cdot 10^{-4}$ моля сернокислого железа. В опытах Л. А. Аваняна и Н. Е. Губиной (1961) развитие вакцинного штамма EV на мясо-пептонных средах с повышенным содержанием железа (50 мг% соли Мора) сопровождалось его интенсивной утилизацией и повышением каталазной активности бактериальных клеток. Среды с указанным количеством солей железа не нуждались в добавлении других известных стимуляторов роста[1].

Многие исследователи наблюдали улучшение роста культур Y. pestis при добавлении к плотным питательным средам сульфита натрия.

В дальнейшем было показано, что его действие связано с изменением окислительно-восстановительного потенциала среды.

Интересный материал о различных потребностях в минеральных веществах вирулентных и авирулентных штаммов при 37° представлен Higuchi с сотр. (1959). По их данным, для роста на синтетической среде, содержащей соли магния, вирулентные клетки нуждаются в присутствии ионов кальция. Авирулентные штаммы в этих условиях обходятся без кальция (за исключением вакцинного штамма EV). При снижении в среде концентрации магния до 2,5 ммоля потребность в кальции возникает и у авирулентных клеток. Соли стронция и цинка могут заменять кальций. Потерю вирулентности при 37° предотвращают добавлением 1,2 ммоля бикарбоната натрия (Baugh e. a., 1964b).

В дальнейшем было показано, что кальций подавляет синтез антигенов вирулентности, в то время как магний его стимулирует (Brubaker, Surgalla, 1964).

---

[1] С помощью сернокислого закисного железа авторам удалось при пассажах на морских свинках повысить вирулентность двух слабовирулентных штаммов. Несколько раньше Jackson и Burrows (см. Brubaker, 1972) получили аналогичный эффект при использовании гемина и железного купороса. Л. А. Аванян, Н. Е. Губина (1961) считают, что железо оказывает косвенное влияние на вирулентность благодаря блокаде ретикулоэндотелиальной системы, однако они не исключают и возможность его участия в синтезе «антигенов вирулентности» Y. pestis. С другой стороны, по данным Н. В. Васильева и Е. В. Юндина (1970), пассирование вирулентных культур через органы белых мышей с одновременным введением микроколичеств железа, магния и кальция несколько угнетает вирулентность.

Оптимальное образование V- и W-антигенов в среде, не содержащей кальция, при 37° наблюдается в присутствии 20 ммолей хлористого магния. В таких условиях не происходит деления вирулентных клеток. Добавление 2,5 ммоля кальция, подавляя синтез этих антигенов, способствует росту культуры. При 31—32° потребность в Ca^{++} исчезает (Л. И. Терентьева, 1971).

Yang и Brubaker (1971) высказали предположение, что кальций и магний влияют на синтез ДНК, поскольку при культивировании вирулентных клеток в Са-дефицитной среде, содержащей ионы магния, при 37° исчезает способность к включению C^{14}-урацила на фоне прекращения размножения клеток. В более поздних работах Yang, Brubaker и др. (см. Brubaker, 1972) показали, что в этих условиях синтез ДНК останавливается лишь после окончания ранее начавшегося цикла репликации и удвоения ядерной субстанции. Следовательно, ферментные системы полимеризации ДНК не чувствительны к недостатку Ca^{++} при 37°. Видимо, стаз, сопровождающийся синтезом V- и W-антигенов, отражает блок, который проявляется после окончания хромосомной репликации, но перед началом инвагинации клеточной стенки и деления.

Для роста вирулентных штаммов необходим определенный баланс между Mg^{++} и Ca^{++}. Интересно, что потребность в этих элементах меняется даже при незначительном повышении температуры от 36 до 37° (Gadgil e. a., 1967а).

При обсуждении исследований, посвященных питанию Y. pestis, надо иметь в виду следующее. Из-за отсутствия референтных штаммов сплошь да рядом работают со случайно отобранными штаммами, одни из которых получают из музеев, другие выделяют из организма животных. Значение этого обстоятельства мы уже обсуждали, говоря об аминокислотах. Но в не меньшей мере оно отражается и на оценке отношения Y. pestis к другим веществам, например углеводам.

Опыты ставят в неодинаковых условиях. Такая нестандартность особенно отразилась на результатах изучения потребности Y. pestis в источниках азота, на которую сильно влияют, в частности, наличие в среде ионов аммония, присутствие углеводов и витаминов, ассортимент аминокислот и их количественное соотношение.

3*

Из числа факторов внешней среды на потребность Y. pestis в питательных веществах исключительное действие оказывает температура культивирования. Пожалуй, первыми на это обратили особое внимание Hills и Spurr (1952)[1]. По их данным, при температуре ниже 32° все использованные штаммы росли на глюкозо-минеральной среде, содержащей всего пять аминокислот — фенилаланин, метионин, цистин, валин, изолейцин — и гемин. При температуре 36° были необходимы еще четыре аминокислоты — аланин, лейцин, серин и треонин, а также биотин и пантотеновая кислота (о влиянии температуры на потребность в витаминах см. выше). Brownlow и Wessman (1960) сообщили, что для культивирования многих штаммов при 37° на среде Хигучи и Карлина (Higuchi, Carlin, 1958) требуется глютамат или две аминокислоты из трех: аргинин, гистидин, пролин. По материалам Burrows и Gillett (1966), при 37° Y. pestis нуждается еще в треонине, пролине, глютамате и опять-таки витаминах; кроме того, благоприятный эффект дает повышенное содержание CO_2 в воздухе. Важно подчеркнуть, что культуры Y. pestis, хранившиеся при 37°, теряют способность использовать глюкозу. Более подробные данные о влиянии температуры на вирулентность и другие свойства Y. pestis содержатся в некоторых разделах настоящей книги, а также в монографии И. В. Домарадского (1966).

Механизм подобного влияния температуры на Y. pestis (и не только на нее) полностью пока не вскрыт. Немалая роль принадлежит, по-видимому, подавлению активности или образования некоторых энзимов, например аспартазы и фумаразы (Н. В. Коробейник, 1968), трансаминазы (Л. С. Оленичева, Г. Т. Атарова, 1969), декарбоксилаз (Н. Я. Шиманюк, 1972) и фосфомоноэстеразы. В результате микроб теряет способность к синтезу тех или иных веществ и становится более прихотливым[2].

Остановимся еще на двух факторах, определяющих питательные потребности Y. pestis: кислородном режи-

---

[1] Сведения о зависимости питательных потребностей Y. pestis от температуры культивирования имеются и в более ранних работах (Doudoroff, 1943, и др.).

[2] Как указывают Gadgil с сотр. (1967b), при 37° нарушается процесс деления клеток Y. pestis. Это сопровождается увеличением отношения ДНК/белок.

ме культивирования (он особенно влияет на потребность в углеводах) и составе среды. Оба они, как, впрочем, и температурный фактор, определяют выбор альтернативных путей обмена, регулируют синтез ферментов и, что весьма существенно, способствуют селекции мутантов, приводящей к изменению состава популяции.

Дыхание

Y. pestis является факультативным анаэробом. Такое заключение основывается на целом ряде известных фактов, характеризующих условия ее роста, дыхательную активность и содержание ферментов, участвующих в переносе электронов.

Y. pestis способна существовать в аэробных и анаэробных условиях. Как и большинство микроорганизмов, в аэробных условиях в качестве конечного акцептора водорода она использует кислород, в анаэробных — восстанавливает другие вещества.

Следует, однако, отметить, что отношение Y. pestis к кислороду гораздо сложнее, чем кажется на первый взгляд.

Многими авторами отмечено положительное влияние на рост Y. pestis в жидких средах аэробных условий, а на твердых средах при небольшой посевной дозе, в отсутствие крови, гемина или восстановителей — пониженного атмосферного давления.

В жидких средах Y. pestis хорошо размножается при нормальном напряжении кислорода, соответствующем содержанию его в атмосферном воздухе, хотя при аэрации, осуществляемой путем непрерывного встряхивания культур или пропускания стерильного воздуха, выход микробных клеток увеличивается. Последнее является следствием насыщения среды кислородом, так как встряхивание культур в разреженном пространстве или пропускание пузырьков азота не улучшает роста. На твердых средах при парциальном давлении кислорода, превышающем 1%, в отсутствие крови или восстановителей микробы быстро погибают (см. обзор И. В. Домарадского, 1958а). Аналогичные данные о положительном влиянии пониженного напряжения кислородом на рост Y. pestis на твердых синтетических средах получены Rockenmacher с сотр. (1952).

Так или иначе, но в аэробных условиях небольшие посевные дозы микроба на твердой среде не дают того количества колоний, которое получается на жидких средах (Herbert, 1949; И. Л. Мартиневский, 1969).

Причины, обусловливающие различия в поведении Y. pestis на жидких и твердых средах, в значительной мере вскрыты Е. Э. Бахрах. Оптимальный уровень окислительно-восстановительного потенциала для начала роста Y. pestis — около 100 мВ при pH 7,1—7,2 (Е. Э. Бахрах, Н. И. Шушерова, 1951). Таким образом, способность Y. pestis развиваться на искусственных средах при прочих равных условиях определяется окислительно-восстановительным состоянием среды (уровнем Eh и окислительно-восстановительной емкостью). Для начала роста культуры на твердых средах из единичных клеток необходимо добавление восстановителей, например сульфита натрия, или пониженное парциальное давление кислорода; при отсутствии указанных условий требуется значительная посевная доза микроба, способная снизить окислительно-восстановительный потенциал среды до нужной величины. По данным Е. Э. Бахрах и В. С. Башевой (1951), при выращивании Y. pestis (штамма EV) на бульоне Хоттингера снижение rH с 25—28 до 8—11 отмечается через 24 часа при посеве 10^8 микробных клеток. При уменьшении концентрации посевного материала указанный уровень потенциала наблюдается только на 2—3-и сутки; соответственно этому задерживается рост микроба.

В процессе развития аэрируемой культуры на бульоне Хоттингера самый низкий уровень окислительно-восстановительного потенциала наблюдается в период активного размножения микробных клеток (через 18 часов). В момент прекращения накопления биомассы (через 24—30 часов) происходит повышение потенциала (Ф. К. Дроздовская, Л. И. Глушко, 1971). Изменение окислительно-восстановительных свойств среды в данном случае, по-видимому, связано как с истощением в ней легко окисляемых веществ, так и со снижением дегидрогеназной активности бактериальных клеток в этой фазе роста.

Сложность вопроса об отношении Y. pestis к кислороду можно иллюстрировать и такими фактами. Условия кислородного режима не одинаково влияют на рост вирулентных и авирулентных культур. По дан-

ным Fukui с сотр. (цит. по И. В. Домарадскому, 1966), выращивание микробов на жидкой аэрируемой среде при 37° приводит к значительной и скорой потере вирулентности, а вместе с ней и V-антигена. Снижение вирулентности не имеет места, если бактерии культивировать на той же среде при 26° или на плотной среде при 26 или 37°. Утрата вирулентности в бульонных культурах при 37° не наблюдается, если начальный pH среды довести до 7,8. Важно, что уменьшение напряжения кислорода может играть роль в поддержании вирулентности Y. pestis при 37°. Потери вирулентности при 37° не наблюдается, если рост Y. pestis происходит во встряхиваемой среде в атмосфере азота или азота с 1% двуокисью углерода. Таким образом, жидкие аэрируемые среды не пригодны для культивирования вирулентных клеток при 37°. Неблагоприятный эффект особенно усиливается при наличии в среде глюкозы. С другой стороны, уменьшение парциального давления кислорода в среде при определенных условиях опять-таки способствует сохранению вирулентности Y. pestis (подробно эти вопросы освещены И. В. Домарадским, 1966).

В соответствии со своим типом дыхания Y. pestis при различном кислородном режиме обусловливает неодинаковую степень окисления используемых ею питательных веществ. В свою очередь степень распада веществ, по-видимому, определяет требовательность микроба к составу питательной среды при росте в аэробных и анаэробных условиях. Известно, что в отсутствие кислорода удовлетворительное развитие культур Y. pestis можно получить лишь на средах, содержащих, помимо основных источников азота и углерода, акцепторы водорода и ферментируемые микробом субстраты в количестве, намного большем, чем требуется для роста в аэробных условиях.

Интенсивность дыхания не всегда соответствует скорости размножения Y. pestis. Например, никотиновая кислота и гематин почти в одинаковой мере способствуют ее росту. Вместе с тем наибольшее стимулирующее действие на дыхание оказывает никотиновая кислота, наименьшее — гематин (Rao, 1940b).

Одним из признаков, отличающих многие анаэробные микроорганизмы от аэробных, является наличие у последних более сложной ферментной системы, катали-

зирующей реакцию между субстратом и акцептором электронов. В состав этой системы у аэробов, как правило, входят ферменты гемопротеиновой природы; некоторые из них способны реагировать непосредственно с кислородом. Для факультативных анаэробов характерно, что конечным акцептором электронов у них может быть не только кислород, но и другие окислители, например, нитраты.

В связи со сказанным интересен факт, характеризующий дыхательный аппарат Y. pestis, а именно его способность восстанавливать нитраты (В. М. Туманский, 1958). Этот признак, помимо того, что он свидетельствует о наличии у Y. pestis цитохромов, в какой-то мере может служить и указанием на эволюционную древность Y. pestis, поскольку «нитратное» дыхание принято рассматривать как предшествующее «кислородному». В качестве доноров водорода при восстановлении нитратов культурами Y. pestis выступают, в частности, глюкоза и глютамат (И. В. Домарадский и др., 1958б).

В отличие от других родственных микробов Y. pestis не способна восстанавливать S_4O_6''.

Englesberg и Levy (1955), исследуя окислительные ферменты штамма А 1122, показали наличие у него энзима, имеющего одинаковую полосу поглощения с гемопротеидами группы С. Цитохром C_{560}, как назвали его авторы, присутствует только в аэробно выращенных культурах.

Mollaret (1962) при попытке выявить цитохромоксидазную активность Y. pestis получил отрицательные результаты. К сожалению, проанализировать их не представляется возможным, поскольку автор в своей работе не приводит методики определения активности фермента.

По данным Е. П. Голубинского с сотр. (1971а), Y. pestis катализирует образование индофеноловой сини из парафенилендиамина и α-нафтола (реактив «Нади») за счет эндогенных субстратов. Установлено, что гомогенаты клеток и препараты цитоплазматических мембран штамма EV способны, хотя и слабо, окислять цитохром С, полученный из сердца лошади. Наличие у микроба цитохромоксидазной активности согласуется с известными материалами об угнетении дыхания и роста культур Y. pestis в присутствии цианидов.

В нашей лаборатории при дифференциальной спектрофотометрии интактных клеток вакцинных штаммов EV, № 17 и высоковирулентного штамма № 1300 обнаружены β- и α-максимумы поглощения (530, 557—560 и 630 ммк), соответствующие цитохромам b_1, b и a_2. На низкотемпературных спектрах максимумы были несколько обострены и сдвинуты в коротковолновую сторону. Интересно, что у интактных клеток цитохромы находятся в почти полностью восстановленном состоянии, в то время как препараты мембран содержат окисленные цитохромы (Е. П. Голубинский и др., 1973б).

При исследовании фотореактивации дыхания Y. pestis в атмосфере O_2 и CO установлено наличие цитохрома o, который является терминальной оксидазой в цепи переноса электронов, непосредственно реагирующей с кислородом. Этим свойством не обладает цитохром a_2. По количественному содержанию цитохромов Y. pestis близка к другим гетеротрофным микроорганизмам.

В отношении локализации цитохромов можно полагать, что они связаны с мембранными структурами клетки, поскольку их удельное содержание в этих образованиях значительно больше, чем в интактных бактериях.

И. В. Домарадским с сотр. (1958б) исследована дегидрогеназная активность Y. pestis по отношению к глюкозе и некоторым аминокислотам. Скорость восстановления метиленового синего под влиянием покоящихся клеток, по данным цитируемых авторов, зависит от условий их культивирования. Наибольшая ферментативная активность к исследуемым субстратам наблюдалась в культурах, выращенных на агаре или бульоне с аэрацией. Анаэробные условия культивирования приводят к уменьшению дегидрогеназной активности. Однако длительное пассирование Y. pestis на бульоне под маслом сопровождается повышением активности дегидрогеназ. Ферментативная активность резко снижается (или совсем отсутствует) у бактерий, выращенных на средах, содержащих 1% глюкозы.

Восстановление метиленового синего катализируется и за счет веществ, содержащихся в бульоне Хоттингера. Основываясь на этом, Е. И. Коробкова и И. В. Лискина (1963) предложили метод ориентировочного определения вирулентности Y. pestis. Ими при изучении

25 вирулентных и авирулентных штаммов, среди которых были и генетически родственные, выявлено, что вирулентные культуры обесцвечивают метиленовый синий медленнее, чем авирулентные. Напротив, В. С. Рудник и С. П. Меринов (1971а) наблюдали возрастание тетразолредуктазной активности клеток в присутствии глюкозы после пассажей авирулентных культур Y. pestis через организм монгольских пищух. Несколько раньше Srikantan с сотр. (1957), а в 1967 г. В. Н. Сагатовский и Л. А. Сагатовская не нашли различий в скорости дегидрирования вирулентными и авирулентными штаммами Y. pestis ряда метаболитов углеводного обмена и цикла трикарбоновых кислот.

Противоречивость результатов обсуждаемых работ, возможно, связана с использованием их авторами разных по механизму действия акцепторов водорода (метиленовый синий и трифенилтетразолхлорид) и исследованием культур, находящихся в неодинаковом физиологическом состоянии. Кроме того, в опытах применялись разные субстраты.

Динамика изменения сукцинатдегидрогеназной активности в процессе роста вакцинного штамма EV показана в работе Dodin и Brygoo (1960). Эти авторы установили, что в первые 24 часа роста культур при 37° продукция формазана не зависит от присутствия в питательной среде янтарной кислоты. Соответствующая активность клеток появляется к концу первых суток и увеличивается до 48 часов роста, после чего медленно снижается до нуля. Такая же закономерность, но с отклонениями во времени на 24 часа, наблюдается и при 26°.

Позднее Ф. К. Дроздовская и Л. И. Глушко (1971), выращивая штамм EV в бульоне при аэрации, показали, что интенсивность восстановления трифенилтетразола в присутствии лимонной кислоты отражает фазы развития культуры, в то время как динамика активности ферментной системы, участвующей в превращении глюкозы, не соответствует кривой роста.

Интересно, что скорость восстановления метиленового синего, трифенилтетразола и неотетразола у Y. pestis коррелирует с ее жизнеспособностью (И. В. Лискина, 1964; В. Н. Сагатовский, 1966; Dodin, Brygoo, 1960). Этот удобный и быстрый в постановке тест некоторые авторы предлагают использовать в качестве

контроля за состоянием культур в вакцинном производстве.

Уместно отметить, что гибель клетки не всегда сопровождается денатурацией ее белка. Большинство бактериальных ферментов, в том числе и дегидрогеназы, получают после предварительного разрушения клеток. Тем не менее эти факты не противоречат вышесказанному, поскольку определение дегидрогеназной активности с помощью метиленового синего и солей тетразолия характеризует не сам фермент, непосредственно реагирующий с субстратом, а целый участок дыхательной цепи, целостность и ориентация ферментов которого, по-видимому, и коррелируют в данном случае с жизнеспособностью клетки.

Исследованию бесклеточных препаратов дегидрогеназ яблочной, молочной, янтарной кислот, НАД-H_2 и НАДФ-H_2 посвящена работа Е. П. Голубинского и В. И. Борзенковой (1970). Авторами показано, что сукцинат- и лактатдегидрогеназы прочно связаны с цитоплазматической мембраной микробной клетки и не переходят в раствор при водно-солевой экстракции. В отличие от этого малатдегидрогеназа является растворимым ферментом. НАД-H_2- и НАДФ-H_2-диафоразная активность определяется в растворимых и нерастворимых фракциях. Важно отметить, что ферменты мембраны проявляют свою активность в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола и совершенно инертны к НАД- и НАДФ-кофакторам. Амитал натрия примерно на 50% подавляет активность диафораз и лактатдегидрогеназы; дегидрогеназа янтарной кислоты не чувствительна к нему.

Y. pestis содержит каталазу и пероксидазу. При неизменных условиях ее существования, обычных для лаборатории, величина каталазной и пероксидазной активности является достаточно постоянным признаком. Однако, как и в случае с дегидрогеназами, она меняется с переменой кислородного режима среды. Так, например, выращивание штаммов в относительно анаэробных условиях вызывает уменьшение активности каталазы на 43—53%, а пероксидазы — на 86—98%. Оптимум действия для каталазы наблюдается при нейтральной реакции среды, для пероксидазы — при щелочной (pH 8,2). Скорость реакции разложения перекиси водорода в культурах Y. pestis прямо пропорциональна

концентрации каталазы. Аналогичная зависимость существует и между активностью пероксидазы и концентрацией полифенола или H_2O_2. Специфические для всех каталаз и пероксидаз ингибиторы подавляют активность соответствующих ферментов (М. Н. Джапаридзе, 1953). Каталаза Y. pestis непрочно связана с клеткой и легко экстрагируется из нее раствором хлористого натрия. Количество фермента снижается в процессе культивирования при 37° и повышается на средах, содержащих железо (Л. А. Аванян, Н. Е. Губина, 1960). Интересно и то обстоятельство, что каталазная активность у пигментированных вариантов, полученных из штамма EV, выше, чем у ахромогенных. Н. Е. Губина и Л. А. Аванян (1971) связывают это явление с лучшей способностью пигментированных вариантов усваивать железо.

По данным Rockenmacher (1949), вирулентные штаммы Y. pestis обладают большей каталазной активностью, чем авирулентные. М. Н. Джапаридзе (1953) и Burrows с сотр. (1964) не смогли подтвердить этого вывода.

Несколько позднее В. С. Рудник и С. П. Меринов (1971б), работая с генетически родственными культурами, установили важную, на наш взгляд, закономерность. Они показали, что каталазная активность Y. pestis изменяется с возрастом культур. Если через 18 часов роста у вирулентных штаммов она достоверно выше, чем у авирулентных, то в более поздние сроки способность тех и других культур расщеплять перекись водорода снижается, а активность каталазы у штаммов с различной вирулентностью нивелируется.

Интересно отметить, что при сравнительном исследовании 36 видов аэробных бактерий (Y. pestis, Aerobacter aerogenes, Bacillus anthracis, Micrococcus lysodeicticus, Bacillus cereus, Escherichia coli и др.) наибольшая каталазная активность обнаружена у Y. pestis (Burrows e. a., 1964).

В настоящее время в связи с изучением дыхательного аппарата микроорганизмов внимание исследователей привлекают мембранные образования у бактерий. Считают, что цитоплазматическая мембрана является основной структурой, на которой фиксированы окислительно-восстановительные ферменты. Л. Н. Кац (1966) считает, что Y. pestis, как и другие грамотрицательные

бактерии, имеет трехслойную цитоплазматическую мембрану, образующую инвагинаты типа мазосом внутрь протоплазмы.

Материалы, полученные недавно в нашем институте Е. П. Голубинским с сотр. (1971б), полностью подтверждают результаты исследований Л. Н. Кац, при этом существенных различий в ультратонком строении клеток вакцинного штамма EV и высоковирулентного штамма № 1300 не найдено. Важной, на наш взгляд, закономерностью является то, что анаэробные культуры, обладающие меньшей окислительной активностью по сравнению с аэробными, имеют и менее выраженные внутренние мембранные образования. Этот факт согласуется с известным положением о локализации дыхательных ферментов у аэробных бактерий в мезосомах.

Интересно, что отмытые физиологическим раствором мембранные структуры Y. pestis, полученные в результате осмотического шока сферопластов, за счет НАД-H_2, НАДФ-H_2 и сукцината восстанавливают феназинметасульфат, 2,6-дихлорфенолиндофенол и метиленовый синий и значительно хуже переносят водород на 2,3,5-трифенилтетразолхлорид и кислород. Интенсивность образования формазана и поглощения кислорода в этих системах возрастает при добавлении к ним водорастворимой фракции клеток Y. pestis (Е. П. Голубинский и др., 1971а). По-видимому, некоторые из терминальных оксидаз микроба непрочно связаны с цитоплазматической мембраной и легко переходят в раствор.

В мембранных образованиях клетки происходят процессы окислительного фосфорилирования. Результаты исследований Е. П. Голубинского с сотр. (1971в) свидетельствуют о том, что субклеточные препараты из штаммов EV и № 17 Y. pestis катализируют сопряженное с фосфорилированием окисление НАД-H_2. Наибольший коэффициент Р/О (0,58) обусловливает смесь цитоплазматических мембран и растворимых белков клетки. Нужно сказать, что система окислительного фосфорилирования Y. pestis совмещает в себе типичные черты бактериального фосфорилирования (с относительно низкой эффективностью и отсутствием дыхательного контроля) с более сложным механизмом сопряжения энергии, характеризующимся разобщающим действием 2,4-динитрофенола и чувствительностью к цианидам.

Изучение свойств и организации ферментов цепи переноса электронов у Y. pestis далеко не завершено. Пока рано делать какие-либо определенные выводы. Тем не менее следует подчеркнуть, что изложенный здесь материал вполне укладывается в рамки современных представлений о дыхательном аппарате факультативно анаэробных микроорганизмов.

Метаболизм

Обмен белков. Реакции трансаминирования являются центральными реакциями азотного обмена и широко распространены в организме животных, у растений и микроорганизмов. Что касается Y. pestis, наличие трансаминирования у нее первоначально доказать не удалось (И. В. Домарадский, 1955, 1958а). Мы объясняли это тем, что в качестве акцептора аминогруппы применялась щавелевоуксусная или пировиноградная кислота. В последующем подобное заключение в отношении упомянутых аминоакцепторов нашло подтверждение в исследованиях Saxena с сотр. (1957). В нашем институте Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой (1967) перенос аминогрупп на щавелевоуксусную кислоту удавалось обнаружить только качественно. Лишь применение Saxena с сотр. (1957) α-кетоглютаровой кислоты как акцептора аминогрупп показало, что Y. pestis не является исключением из общего правила. В их опытах с экстрактами из вирулентных и авирулентных клеток в роли доноров аминогрупп могли выступать L-изомеры аланина, лейцина, изолейцина, норлейцина, фенилаланина, валина, метионина, норвалина, аспарагина и DL-аспарагиновой кислоты. Максимальная скорость трансаминирования отмечалась при pH 8,0. Добавление пиридоксаля было необходимо только для переноса аминогруппы с аланина на α-кетоглютарат. Из 14 ядов, испытанных авторами, наибольшее действие на реакции трансаминирования оказывали ионы двухвалентной ртути.

Более подробно процессы трансаминирования изучены Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой (1967). Наличие трансаминаз обнаружено ими как при работе с цельными клетками Y. pestis, так и с экстрактами из них (табл. 5). Наиболее активными донорами аминогрупп оказались аспартат и аспарагин. Трансаминиро-

вание аспарагина сопровождалось его дезаминированием, что, по мнению Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой, свидетельствует о наличии у Y. pestis аспарагиназы II.

Интересно, что в реакции трансаминирования вовлекались такие аминокислоты, которые, по нашим данным, не подвергаются прямому дезаминированию и не окисляются Y. pestis. Из их числа следует выделить гистидин и тирозин, поскольку первый в опытах индийских авторов в реакцию с α-кетоглютаратом не вступал вообще, а второй реагировал с ним значительно слабее, чем в исследованиях Л. С. Оленичевой.

Таблица 5

Образование глютаминовой кислоты при переаминировании аминокислот с α-кетоглютаратом в экстрактах из клеток Y. pestis (по Л. С. Оленичевой, Г. Т. Атаровой, 1967)

Аминодоноры	Глютаминовая кислота (в мкмолях на 1 мг) белка		
	штамм № 1	штамм EV	штамм № 17
Аспарагин	3,8	3,7	2,1
Аспарагиновая кислота	3,7	3,3	2,0
Фенилаланин	2,6	2,5	1,5
Тирозин	2,3	1,5	1,4
Триптофан	2,0	1,6	0,9
Валин	1,9	1,8	1,2
Лейцин	1,8	2,4	1,1
Метионин	1,9	1,7	0,7
Гистидин	0,9	1,5	0,5
Аланин	0,5	1,0	0,3

О наличии у Y. pestis способности катализировать перенос аминогрупп на щавелевоуксусную кислоту говорилось выше.

Некоторые свойства аминотрансфераз были изучены Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой (1967) на примере аспартат-аминотрансферазы. Максимальная скорость этого фермента при pH 8,0. Скорость реакции между аспартатом и α-кетоглютаратом примерно одинакова как в фосфатном, так и в вероналовом буфере. При разведении препаратов фермента отмечается увеличение его удельной активности. Гидроксиламин, семикарбазид и сульфат меди являются ингибиторами аспартат-аминотрансферазы. Добавление фосфопиридоксаля к диализованным экстрактам из бактерий, хотя и не полностью, восстанавливало активность фермента.

Исходя из приведенных данных, надо думать, что образование и распад аминокислот у Y. pestis в основном осуществляются с помощью различных аминотранс-

фераз. Однако метаболизм аминокислот может идти и другими путями, среди которых немалая роль, по-видимому, принадлежит прямому дезаминированию и аминированию. При этом следует указать, что оценка относительного значения прямых и различных непрямых механизмов аминирования и дезаминирования в различных биологических объектах (в том числе и у Y. pestis) требует большой осмотрительности и представляет отнюдь не легкую задачу.

Способность к дезаминированию аминокислот мы изучали на четырех авирулентных штаммах — EV, №1, 17 и 235 (И. В. Домарадский, 1955). Наиболее интенсивное превращение с поглощением кислорода и отщеплением аммиака свойственно глютаминовой кислоте, аланину, серину, треонину и пролину. Слабее окисляются и дезаминируются аспарагиновая кислота, гликокол, цистеин, валин, норлейцин и фенилаланин (в последнем случае мы не отмечали накопления аммиака). Не подвергаются дезаминированию и не окисляются тирозин, триптофан, метионин, гистидин, лейцин и диаминомонокарбоновые кислоты[1]. Отсутствие способности к прямому дезаминированию последних аминокислот было подтверждено результатами специальных исследований, в ходе которых концентрацию аминокислот — гистидина, метионина, триптофана и аргинина — определяли с помощью цветных специфических реакций (В. Д. Егорова, И. В. Домарадский, 1958).

В опытах Sagar с сотр. (1956) отмытые клетки восьми авирулентных и вирулентных штаммов дезаминировали (в порядке интенсивности) серин, глицин, аспарагин и цистеин. По данным же Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой (1968), под влиянием авирулентных штаммов Y. pestis с максимальной скоростью дезаминируются аланин, аспартат, орнитин, серин, цистеин, слабее — фенилаланин и метионин. Интересно, что Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой (1967) удавалось наблюдать распад гистидина, но только в присутствии одной из субкультур штамма EV.

Чем объяснить расхождения результатов всех указанных авторов, сказать трудно. Причина скорее всего

---

[1] В случае окисления аминокислот удается наблюдать образование CO_2, которое скорее всего связано с окислительным дезаминированием промежуточных продуктов метаболизма аминокислот.

в нестандартизированных условиях постановки опытов. Подтверждением служат следующие факты.

При отсутствии кислорода мы наблюдали дезаминирование только двух аминокислот — аспартата и серина (сравните с данными Sagar с сотр., 1956); превращения глютамата и аланина осуществлялись лишь при наличии в среде соответствующих акцепторов водорода. Не исключено, что больший диапазон дезаминируемых аминокислот в нашем случае по сравнению с диапазоном в опытах индийских авторов и Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой был обусловлен проведением первых экспериментов в условиях аэрации.

На дезаминазную активность Y. pestis немалое влияние оказывает среда культивирования. Это положение лучше всего иллюстрирует табл. 6. Кроме того, следует учитывать, что добавление к средам глюкозы приводит к резкому угнетению дезаминирования, причем такое действие углевода не связано с изменением pH во время роста микроба (И. В. Домарадский, 1955).

Таблица 6

Влияние среды на дезаминазную активность некоторых штаммов Y. pestis (по Sagar с сотр., 1956)

Среда	Вирулентный Q		Авирулентный № 1	
	L-серин	глицин	L-серин	глицин
Бульон из казеина, гидролизованного трипсином	32,2[1]	6,5	64,8	6,8
Агар из того же бульона	21,1	4,2	22,8	3,9
Бульон из настоя бычьего сердца	13,3	1,5	40,3	3,9
Агар из того же бульона	4,5	0	20,5	0
Питательный бульон	14,4	2,9	40,0	4,6
Агар из того же бульона	6,5	1,5	29,1	2,3

[1] Мкг азота аммиака, образованного при дезаминировании.

Еще одну причину расхождения данных по дезаминированию (и не только по дезаминированию!) мы усматриваем в том, что обычно различные авторы применяют неодинаковые штаммы. Иногда в силу неоднородности клеточного состава популяций (см. раздел «Питание») при работе с несколькими субкультурами даже

одного и того же штамма получают противоречивые результаты.

Существенный интерес представляют данные о влиянии на процесс дезаминирования и на потребление кислорода отмытыми клетками Y. pestis добавления к одной аминокислоте других, а также глюкозы или продуктов ее метаболизма (подобная постановка опытов имитирует условия, возникающие при росте на синтетических средах). Как установлено (И. В. Домарадский, 1955), при добавлении к одной аминокислоте другой общее потребление кислорода не увеличивается. Например, в системе, состоящей из аланина, аспартата и глютамата, количество потребленного микробами кислорода или равно сумме его объемов, приходящихся на каждую из аминокислот, или несколько меньше. Более того, при наличии в среде цистеина в комбинации с глютаминовой кислотой или пролином наблюдается значительное снижение потребления кислорода клетками. Это особенно заметно в случае использования смесей, состоящих из многих компонентов. Здесь мы сталкиваемся с явлением, напоминающим антагонизм между аминокислотами в процессе роста микробов (И. В. Домарадский, В. А. Иванов, 1957).

Аналогичные результаты получены и при изучении динамики образования аммиака. Добавление глюкозы к пробам, состоящим из двух или более аминокислот, приводит к значительному снижению потребления кислорода и образования аммиака Y. pestis (поглощение кислорода намного меньше, чем можно было бы ожидать, основываясь на данных об окисляемости каждого из компонентов среды отдельно взятого). То же наблюдается, если к аспартату, глютамату или аланину вместо глюкозы добавляется щавелевоуксусная кислота, пируват или малат. Ряд дополнительных опытов позволил нам сделать вывод, что в присутствии глюкозы или продуктов ее метаболизма тормозится полное окисление аминокислот; они дезаминируются, но их углеродный скелет остается незатронутым и может, по-видимому, использоваться для пластических целей. В данном случае имеется полная аналогия с тем, что происходит в синтетических средах, поскольку в отсутствие глюкозы или при замене ее трудно ассимилируемым источником углерода (глицерин, цитрат) скорость роста культуры значительно снижается.

Согласно нашим данным, глюкоза не оказывает влияния только на окисление смеси аминокислот, состоящей из цистеина, пролина и фенилаланина. Очевидно, это объясняется своеобразием механизма превращения цистеина и пролина.

Дезаминирование аминокислот происходит под влиянием не только цельных клеток, но и экстрактов из них (Л. С. Оленичева, Г. Т. Атарова, 1968), однако поглощения кислорода при этом не отмечается.

Оптимальные условия дезаминирования аминокислот Y. pestis, по Sagar с сотр. (1956), 37° и pH 7,0—7,5; в опытах Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой в случае аланина оптимум наблюдался при pH 7,4—8,0.

Изониазид, гидроксиламин, аминогуанидин и арсенит в той или иной мере тормозят процесс дезаминирования (И. В. Домарадский, 1955; Л. С. Оленичева, Г. Т. Атарова, 1968).

Переходим к вопросу о декарбоксилировании аминокислот Y. pestis. Наличие декарбоксилаз аминокислот у Y. pestis установлено совсем недавно (Н. Я. Шиманюк, 1972). Ранее мы считали (И. В. Домарадский, 1955, 1958б), что этот микроб не декарбоксилирует аминокислоты.

Все испытанные штаммы Y. pestis образуют декарбоксилазу аргинина, а некоторые из них — также гистидина. Как и у других микробов, активность декарбоксилаз зависит от условий культивирования (Н. Я. Шиманюк, 1972). Лучшей средой для образования декарбоксилаз Y. pestis является 1,5% агар Хоттингера с 1% кукурузного экстракта и pH 7,1, а оптимальной температурой — 26—28°; при 37° декарбоксилазы продуцируются слабо. Максимальное декарбоксилирование аргинина и гистидина происходит в ацетатном буфере с ионной силой 0,1 и pH 4,6 и 5,0 соответственно.

Судьба аминов, образуемых Y. pestis, пока неизвестна. Возможно, что они могут окисляться диаминооксидазами или вступать в реакции трансаминирования. Не выяснена также роль этих аминов в патогенезе чумы.

Теперь подробнее остановимся на обмене отдельных аминокислот. Начнем с моноаминодикарбоновых, поскольку их основная роль вряд ли вызывает у кого-либо сомнения. Как уже указывалось, под влиянием изученных нами штаммов аспарагиновая кислота подвер-

гается дезаминированию в аэробных и анаэробных условиях, что натолкнуло на мысль об образовании Y. pestis аспартат-аммиак-лиазы (аспартаза). Соответствующие опыты подтвердили это (И. В. Домарадский, 1955). В дальнейшем свойства аспартазы были подробно изучены Н. В. Коробейник при нашем участии (И. В. Домарадский, Н. В. Коробейник, 1967; Н. В. Коробейник, 1968).

Прежде всего установлено, что аспартазу образуют далеко не все штаммы. Обычно ее удавалось обнаружить у авирулентных штаммов — № 1, 17, EV-486, № 1340 и ЖBR, в то время как в опытах с вирулентными штаммами — № 773, 1204, 1205, 1206, 1210, 1211, 1230, 1300 и 1565 — получались отрицательные результаты. Из этого был сделан предположительный вывод об обратной связи между образованием аспартазы и вирулентностью Y. pestis. Однако в последующем от такого вывода пришлось отказаться, поскольку аспартаза не была обнаружена и у нескольких авирулентных штаммов (№ 1190, 1230-A, TS, № 154 и EV-76).

Кроме того, выяснилась еще одна очень важная деталь, а именно резкое снижение активности аспартазы при изменении температуры культивирования от 28 до 37°. При этом аспартатпозитивные штаммы фенотипически превращаются в аспартатнегативные. Влияние температуры выращивания особенно отражается на способности Y. pestis синтезировать аспартат из яблочной кислоты.

Н. В. Коробейник (1968) удалось выделить фермент и очистить его примерно в 50 раз. Полученный препарат оказался свободным от фумаразы, аспарагиназы и сукцинатдегидрогеназы. Оптимум действия фермента лежит при pH 7,0—8,0 и ионной силе от 0,025 до 0,1; температурный оптимум приходится примерно на 40°. Добавление п-хлормеркурибензоата, йодацетата, йодацетамида и монойодуксусной кислоты, ингибирующих аспартазу, показало, что для проявления ее активности необходимо присутствие свободных SH-групп. Торможение фермента ЭДТА и ионами двухвалентной ртути или меди, серебра и цинка говорит в пользу принадлежности аспартазы к числу металлопротеидов.

Процесс, катализируемый аспартазой Y. pestis, как и аспартазой других бактерий, является обратимым и сдвинут в сторону синтеза аспартата; $K_{eq}=3{,}8\cdot10^{-2}$.

Образование аспартата протекает по типу реакции первого порядка. Константа Михаэлиса при изменении концентрации фумарата — одного из компонентов реакции — составляет $4{,}8 \cdot 10^{-3}$ моля, а хлористого аммония — второго компонента — $7{,}0 \cdot 10^{-3}$ моля. Оптимальное молярное соотношение фумарата и аммония при образовании аспартата Y. pestis — 1 : 3 (Н. В. Коробейник, И. В. Домарадский, 1968).

Не исключено, что у штаммов Y. pestis, образующих аспартазу, этот фермент имеет большое значение для ассимиляции аммиака. Однако, поскольку большинство штаммов Y. pestis аспартазу не образуют, а в процессе культивирования при 37° даже аспартатпозитивные штаммы становятся негативными, надо думать, что аспартазный путь усвоения аммиака является далеко не главным.

При обсуждении вопроса об ассимиляции аммиака с помощью аспартазы следует учитывать данные Brubaker и Sulen (1971), свидетельствующие о репрессии аспартазной и трансгидрогеназной систем у чумного микроба в присутствии ионов NH_4^+. Указанное явление, по мнению авторов, связано также с биосинтезом глютамина.

Метаболизм глютаминовой кислоты изучали в нашей лаборатории Л. С. Оленичева и Г. Т. Атарова (1969). Для исследования они использовали как гомогенаты, так и экстракты из клеток авирулентных штаммов Y. pestis (№ 1, EV, № 17, 556, 1340, 1901, 1190, 154 и 19), из которых часть обладала способностью продуцировать аспартазу. О синтезе глютамата авторы судили по результатам хроматографии на бумаге проб с α-кетоглютаратом и хлористым аммонием после инкубации их при 37°. В итоге было установлено, что все испытанные штаммы образуют глютамат. Как показали дальнейшие исследования, в процессе восстановления α-кетоглютарата принимает участие НАДФ-H_2 (но не НАД-H_2), что послужило поводом для заключения о наличии у Y. pestis НАДФ-зависимой глютаматдегидрогеназы. Небезынтересно, что в экстрактах из клеток обратная реакция — дегидрирование глютамата — хотя и наблюдалась, но протекала крайне медленно.

Обращает на себя внимание факт снижения интенсивности синтеза глютамата при культивировании Y. pestis при температуре 37° (Л. С. Оленичева и др. 1969).

На основании всего сказанного, а также результатов опытов по трансаминированию Л. С. Оленичева и Г. Т. Атарова сделали следующие предположительные выводы:

1. Y. pestis содержит две глютаматдегидрогеназы — растворимую и связанную со структурой клеток.

2. Фермент, связанный со структурой, катализирует как синтез, так и распад глютамата.

3. Растворимая глютаматдегидрогеназа обеспечивает лишь синтез глютамата, а распад его осуществляется непрямым путем за счет переноса аминогруппы на щавелевоуксусную кислоту.

В общем с выводами Л. С. Оленичевой и Г. Т. Атаровой можно согласиться и признать, что фиксация аммиака Y. pestis происходит в основном за счет действия глютаматдегидрогеназы, хотя не все еще здесь ясно. Но вторую часть последнего вывода принять нельзя главным образом потому, что процесс трансаминирования глютамата у аспартатнегативных штаммов не может приводить к освобождению аммиака. Что касается вопроса о путях обмена аспарагиновой кислоты у штаммов, лишенных аспартазы, то в этом случае следует допустить наличие непрямых механизмов, особенно при распаде аспартата. Имеющиеся факты позволяют постулировать следующую цепь реакций:

аспартат + α-кетоглютарат = щавелевоуксусная кислота + глютамат,

глютамат = аммиак + α-кетоглютарат,

щавелевоуксусная кислота = $CO_2 + H_2O$.

В сумме указанные реакции выглядят как прямое окисление аспарагиновой кислоты. К сожалению, подобный механизм пока применим лишь для объяснения окисления аспартата цельными клетками.

Основными источниками α-кетоглютаровой и щавелевоуксусной кислот для Y, pestis, как и для других организмов, по-видимому, являются окисляемые углеводы. В пользу этого говорят результаты наших опытов с ацетатом, меченным по углероду карбоксильной группы (И. В. Домарадский, А. Ф. Семенушкина, 1958). После выращивания на среде с $CH_3C^{14}OOH$ около 45% всей радиоактивности белковой фракции бактерий было обнаружено в составе моноаминодикарбоновых кислот, причем концентрация C^{14} в глютамате оказалась примерно на 1/3 выше, чем в аспарагиновой кислоте.

Из числа других аминокислот на сегодняшний день лучше всего изучен обмен трех: цистеина, серина и гликокола.

В присутствии цистеина потребление кислорода Y. pestis происходит в широком диапазоне значения pH (от 5,5 в фосфатном до 9,0 в боратном буфере) и резко снижается при наличии в среде арсенита натрия или 2,4-динитрофенола; последний угнетает также эндогенное дыхание клеток. Десульфирование цистеина осуществляется как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Культивирование Y. pestis на средах с повышенным содержанием цистеина сопровождается увеличением активности фермента, катализирующего распад этой аминокислоты.

Помимо сероводорода, продуктами распада цистеина являются аммиак и пировиноградная кислота. Последняя легко улавливается при работе с убитыми толуолом бактериями или ацетоновыми препаратами клеток (И. В. Домарадский, В. Д. Егорова, 1959).

На основании этого напрашивается вывод о наличии у Y. pestis цистеиндесульфгидразы, действие которой обратимо. В пользу сказанного свидетельствует также способность прототрофных мутантов синтезировать цистеин de novo. Источниками серы при образовании цистеина, по мнению Doudoroff (1943) и Englesberg (1952), могут служить сульфиты, тиосульфаты и сульфиды. В нашей лаборатории аспирант В. В. Король показал, что в определенных условиях Y. pestis ассимилирует и сульфаты. В его опытах с метионинзависимым ауксотрофным штаммом EV метка S^{35}-сульфата обнаруживалась в цистеине. Более восстановленные формы неорганической серы практически подавляли включение $Na_2S^{35}O_4$. Аналогичный эффект обусловливает цистеинсульфиновая кислота. Соответствующую цепь реакций можно представить так: сульфат→сульфит→тиосульфат→сульфид→цистеин. В синтезе цистеина, по-видимому, также участвует и цистеинсульфиновая кислота (В. В. Король и др., 1973).

Менее ясен вопрос о взаимопревращении цистеина и метионина. Как показано Englesberg (1952) в опытах по питанию, цистеин не заменяет метионин. В то же время потребности в метионине удовлетворяются цистатионином и гомоцистеином. Из этого вытекает, что ци-

стеин не может превращаться в метионин из-за неспособности микроба катализировать реакцию цистеин→цистатионин. С другой стороны, И. В. Домарадский (1957) при выращивании Y. pestis на среде с S^{35}-цистеином обнаружил в составе белков клеток радиометионин.

Судя по данным Doudoroff (1943), Englesberg (1952) и И. В. Домарадского (1957), метионин в цистеин не превращается. По мнению Englesberg, это связано с блоком на этапе цистатионин→цистеин. Из опытов же Doudoroff следует, что метионин не переходит в цистеин из-за необратимости реакции гомоцистеин→метионин. И тем не менее нельзя было полностью исключить возможность превращения метионина в цистеин. Иначе чем еще объяснить рост некоторых диких штаммов и метионинзависимых мутантов Y. pestis на средах без цистеина (И. В. Домарадский, 1955; Ю. Г. Сучков и др., 1967)?

Позднее И. В. Ряпис с сотр. (1971а), анализируя питательные потребности мутантов, зависимых от серусодержащих аминокислот, пришли к выводу, что прототрофные варианты Y. pestis катализируют реакции в обоих направлениях: цистеин — цистатионин — гомоцистеин — метионин.

Эти данные подтверждены В. В. Король (1973) с помощью радиометионина и меченых неорганических форм серы. Им же в аналогичных опытах показано, что в отличие от прототрофного варианта у исходного штамма EV нарушены прямая и обратная реакции процесса взаимопревращения цистеина и метионина в стадии цистеин⇄цистатионин.

По данным Levine с сотр. (1954), отмытые суспензии клеток Y. pestis окисляют только L-изомер серина; если используется DL-серин, скорость реакции уменьшается вдвое. В случае добавления 2,4-динитрофенола к пробам, содержащим серин, потребление кислорода клетками резко возрастает. В присутствии этого яда L-серин дезаминируется согласно уравнению:

$$CH_2OH\ CHNH_2COOH + 2^1/_2O_2 = 3CO_2 + NH_3 + 2H_2O.$$

Реакция идет через стадию образования пировиноградной кислоты, выделенной и идентифицированной с помощью 2,4-динитрофенилгидразина. Однако продуцирование пировиноградной кислоты удается показать толь-

ко при соблюдении условий, препятствующих ее окислению (при наличии в среде арсенита натрия и при pH 9,1). Максимальное потребление кислорода в присутствии серина имеет место при pH 6,8.

В процессе роста Y. pestis в аэробных условиях или под влиянием суспензий покоящихся клеток гликокол окисляется с образованием аммиака и углекислоты:

$$CH_2NH_2COOH + 1^1/_2O_2 = 2CO_2 + NH_3 + H_2O.$$

Y. pestis также способна утилизировать гликокол при росте на таких сложных средах, какими являются перевары Хоттингера. При этом радиоактивный углерод гликокола используется, по-видимому, для синтеза разнообразных компонентов протоплазмы клетки. В частности, наличие C^{14} показано в составе белков микроба. Превращение гликокола в другие аминокислоты с достоверностью установить не удалось. Особенно интересно, что способностью утилизировать гликокол обладают не только растущие или покоящиеся клетки, но и их суспензии, обработанные ацетоном. Однако в процессе роста микроба на сложных синтетических средах возможность использования им гликокола ограничена; об этом можно судить по тому, что присутствие в среде легкоусваиваемых источников углерода и азота подавляет внедрение C^{14} (из гликокола) в клетку (И. В. Домарадский, А. Ф. Семенушкина, 1957).

Определенный прогресс в изучении обмена аминокислот недавно был достигнут благодаря успехам генетики. Основная заслуга в этом принадлежит Ю. Г. Сучкову. Занимаясь исследованием влияния мутагенов на Y. pestis, Ю. Г. Сучков с сотр. (1971б) получили ряд мутантов, обладающих блоком в различных звеньях цепи синтеза отдельных аминокислот и других соединений. В итоге ему удалось расшифровать пути синтеза аргинина, триптофана и пролина.

Согласно его данным, синтез Y. pestis указанных аминокислот может быть представлен следующими схемами:

орнитин→цитруллин→аргинин [1],
аспартат→глютамат→пролин,
антраниловая кислота→индол→индол+серин→триптофан.

---

[1] Существование этих этапов образования аргинина подтверждено тестом синтрофизма (Ю. Г. Сучков и др., 1971б).

На основании анализа схем напрашивается вывод о том, что метаболизм аргинина, пролина и триптофана у Y. pestis не составляет исключения из общего правила. Правда, у некоторых других организмов пролин является необходимым предшественником орнитина. Впрочем, данные Ю. Г. Сучкова нельзя рассматривать как окончательные. В частности, предстоит еще доказать наличие у Y. pestis ферментов, принимающих участие в соответствующих синтезах, и решить вопрос о механизме распада всех компонентов описанных реакций.

В связи с этим уместно напомнить такие факты из физиологии Y. pestis:

1. Реакция превращения аспартата в глютамат является обратимой и осуществляется за счет трансаминаз.

2. Аргинин и триптофан относятся к числу недезаминируемых аминокислот, однако они вступают в реакции трансаминирования, а аргинин к тому же и декарбоксилируется.

3. Индол обычно не образуется, поскольку отсутствует фермент триптофаназа.

4. Пролин легко окисляется и дезаминируется, а орнитин дезаминируется с образованием аспартата, глютамата и, вероятно, пирролидонкарбоновой кислоты — ближайшего предшественника пролина (Л. С. Оленичева, Г. Т. Атарова, 1968).

В заключение необходимо указать, что проблема обмена аминокислот у Y. pestis, несмотря на большие успехи, достигнутые в последние годы, по-прежнему далека от окончательного разрешения. В дальнейшем желательно больше внимания уделять выяснению соотношения между прямыми и непрямыми механизмами превращения отдельных аминокислот, для чего прежде всего нужно определить, образует ли Y. pestis оксидазы L- и D-аминокислот. Кроме того, следует глубже изучать судьбу отдельных аминокислот и пути превращения одной аминокислоты в другую, шире применяя для этого ауксотрофные мутанты. В том, что взаимопревращение играет немалую роль в метаболизме Y. pestis, убеждают нас приведенные выше данные Ю. Г. Сучкова, а также выявление феномена синтрофизма, который наряду с мутациями к прототрофности (или мейотрофности) может обеспечивать переживание ауксотрофных

штаммов на «голодных» средах (С. А. Лебедева и др., 1970).

Обмен нуклеиновых кислот. В последние годы резко возрос интерес к нуклеиновым кислотам. Причину такого интереса вряд ли надо объяснять. Отразилось это и на изучении обмена нуклеиновых кислот у Y. pestis. Прежде всего привлек к себе внимание вопрос о путях распада нуклеиновых кислот и входящих в их состав компонентов.

Поскольку расщепление нуклеиновых кислот начинается с действия нуклеаз, следовало выяснить, образует ли Y. pestis указанные ферменты. Соответствующие опыты, проведенные Woodward (1944), позволили в принципе положительно ответить на этот вопрос. Как установил Woodward, живые и убитые клетки Y. pestis или экстракты из них обладают способностью деполимеризовать дрожжевую РНК практически без освобождения неорганического фосфора. В процессе деполимеризации часть РНК распадается до тетрануклеотидов; кроме того, образуется небольшое количество мононуклеотидов. Фермент Y. pestis, осуществляющий разрыв фосфорно-диэфирных связей в молекуле РНК, относительно термостабилен. При нагревании его способность вызывать деполимеризацию РНК лучше всего сохраняется при pH 6,5, а «тетрануклеотидазная» и «мононуклеотидазная» активность — при pH 7,6. Более детально нуклеазная активность Y. pestis не изучена до сих пор.

Из работ, которые могут представлять интерес в этом плане, следует указать на исследования Е. П. Голубинского с сотр. (1970) и Л. В. Линниковой с сотр. (1971) о наличии и свойствах фосфомоноэстераз Y. pestis. Изучив более 20 музейных штаммов и их мутантов, авторы выявили, что большинство из них обусловливает гидролиз самых разнообразных веществ, содержащих моноэстерифицированный фосфат. Фосфатазная активность зависит от условий культивирования, она значительно снижается при температуре 37° и в присутствии неорганического фосфора. При цитохимическом исследовании АТФ-азы и щелочной фосфатазы с помощью окраски соответствующих ферментативных центров $CoNO_3$ мы постоянно наблюдали образование гранул кобальта на клеточной стенке бактерий и в их цитоплазме.

В последующих работах основное внимание уделялось азотистым основаниям. По данным Misra с сотр. (1960), авирулентные и вирулентные штаммы Y. pestis легко дезаминируют цитидин и цитидиловую кислоту и слабее — цитозин. Пуриновые основания — аденин и гуанин, равно как и их производные — нуклеозиды и нуклеотиды, если и дезаминируются, то очень слабо[1]. По отношению к дезаминируемым соединениям существенных различий между штаммами установить не удалось. Так, количество азота, образованного за счет цитидина, в случае вирулентных штаммов колебалось от 13 до 22 мкг, а в случае авирулентных — от 13 до 21,2 мкг. При использовании цитидиловой кислоты количество найденного азота варьировало от 2,5 до 9,5 и от 3 до 8,5 мкг соответственно. Не удалось также установить какого-либо влияния среды культивирования на способность Y. pestis дезаминировать азотистые основания и их производные. Это представляет безусловный интерес, так как на многие другие свойства Y. pestis среда культивирования оказывает весьма заметный эффект. В то же время в анаэробных условиях дезаминирование цитидина и цитидиловой кислоты протекало несколько слабее, чем в аэробных. Оптимум дезаминирования цитидина и цитидиловой кислоты был найден при pH 7,0. Изменение pH от 7,0 до 8,0 снижало скорость реакции в среднем на 28%. В кислой же зоне дезаминирование цитидина оказалось сравнительно менее чувствительным к изменениям реакции среды. Ни одно из испытанных соединений, за исключением ионов тяжелых металлов, по существу не препятствовало дезаминированию цитидина и цитидиловой кислоты. Даже вещества, обладающие хелатным действием, например 8-оксихинолин или гидроксиламин, были неэффективными. Из числа же ионов тяжелых металлов полное торможение процесса вызывали одновалентная ртуть и серебро; цинк обусловливал лишь частичное торможение, несколько более выраженное в присутствии цитидиловой кислоты.

Е. П. Голубинский (1965), помимо способности к дезаминированию, выявил также возможность окисле-

---

[1] Причина образования аммиака за счет ксантина непонятна. Дело в том, что в отличие от аденина и гуанина ксантин не содержит свободной аминогруппы.

ния оснований и их нуклеозидов в аэробных и анаэробных условиях. Заметное поглощение кислорода авирулентными штаммами Y. pestis наблюдалось только в случае аденозина и особенно цитидина. В опытах с другими субстратами оно не отличалось от потребления кислорода в контроле. В анаэробных условиях микроб окислял лишь цитидин. Он же подвергался дезаминированию. Образование аммиака за счет других соединений выявить не удалось. Освобождение азота из цитидина происходило со значительной скоростью и фактически заканчивалось к 90-й минуте инкубации. С помощью хроматографии на бумаге было установлено, что конечным продуктом метаболизма цитидина является урацил.

Сопоставление всех полученных данных позволило Е. П. Голубинскому составить весьма обоснованную схему распада цитидина. Сначала осуществляется гидролитическое отщепление аммиака и превращение цитидина в уридин — нуклеозид урацила. Затем уридин распадается, вероятно, под влиянием одной из гидролаз N-глюкозидных соединений (уридинрибогидролазы?). Наконец, происходит деградация D-рибозы — единственный окислительный процесс во всей цепи реакций; окисление рибозы установлено Santer и Ajl (1955a) и подтверждено Е. П. Голубинским (1965).

Значение указанного пути распада цитидина для жизнедеятельности Y. pestis было продемонстрировано Е. П. Голубинским (1965) путем выращивания одного из его прототрофных мутантов на минимальной среде с сернокислым аммонием и различными азотистыми основаниями и их нуклеозидами; рост отмечался только при наличии цитидина. Несмотря на многочисленные усилия автора, причина поглощения кислорода Y. pestis за счет аденозина осталась невыясненной. Объяснить ее окислением рибозы нельзя, поскольку соответствующая нуклеозидаза у этого микроба выявлена не была.

Е. П. Голубинский (1965) установил, что при росте Y. pestis на синтетических средах уменьшается концентрация азотистых оснований и их нуклеозидов. Более заметно изменялось содержание свободных оснований. Поскольку возможности микроба к окислению и дезаминированию азотистых оснований весьма ограничены, результаты этих опытов можно объяснить только ис-

пользованием пуриновых производных в процессе роста для синтеза нуклеиновых кислот.

С другой стороны, известно, что дикие штаммы Y. pestis на синтетических средах обычно обходятся без пуриновых и пиримидиновых оснований. Больше того, получить мутанты, зависимые от пуринов и пиримидинов, чрезвычайно трудно. Еще недавно пуринзависимые штаммы имелись только у Burrows (1960) и И. Л. Мартиневского и Л. М. Осадчей (И. Л. Мартиневский, 1969) (пиримидинзависимые мутанты как будто бы до сих пор получены не были).

Это дало возможность предположить, что все компоненты нуклеиновых кислот Y. pestis легко синтезирует сама.

Как показали М. Л. Беккер (1967) и В. Г. Майский (1968), Y. pestis синтезирует азотистые основания нуклеиновых кислот за счет формиата. Для этого же она, по-видимому, использует ацетат и гликокол (И. В. Домарадский, А. Ф. Семенушкина, 1957, 1958). Скорость включения радиоактивного формиата в общем отражает динамику содержания РНК в клетке. Наоборот, скорость внедрения метки в ДНК мало меняется с возрастом культуры, что связано с большей стабильностью содержания ДНК во всех фазах роста микроба. В количественном отношении радиоактивность ДНК была намного меньше, чем РНК. Как и следовало ожидать, радиоактивный углерод формиата обнаруживался только в пуриновых основаниях нуклеиновых кислот, причем метка распределялась между аденином и гуанином примерно поровну. Соответствующими данными о распределении метки ацетата или гликокола между азотистыми основаниями нуклеиновых кислот Y. pestis мы пока не располагаем.

Что касается пиримидиновых оснований, то один из предшественников их у Y. pestis — аспарагиновая кислота (В. Г. Майский, 1967б). Другим источником углерода и азота пиримидинов является карбамоилфосфат, образование которого происходит с помощью карбаматкиназы. Наличие этого фермента постулируют Baugh с сотр. (1964a). Существенное звено в синтезе карбамоилфосфата — фиксация CO_2 (см. ниже). Перенос карбамоила на аспартат осуществляет аспартаткарбамоилтрансфераза, также обнаруженная у Y. pestis Baugh с сотр. (1964a).

Важно подчеркнуть, что у вирулентных клеток при определенных условиях роста (37° и аэрация) может нарушаться синтез карбамоилфосфата, и тогда для их развития нужно добавлять к среде карбонаты натрия и аммония (последний в водных растворах обычно находится в равновесии с карбаминовокислым аммонием) или оротовую кислоту (общий предшественник всех пиримидинов), обязанную своим происхождением N-карбамоил-L-аспартату. Последнее служит основным доказательством участия карбамоилфосфата в синтезе пиримидинов Y. pestis.

Хотя более детальных сведений о механизме синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований мы не имеем, сказанное выше позволяет сделать вывод о сходстве путей образования указанных соединений Y. pestis и другими организмами. Если это действительно так, то надо думать, что сначала Y. pestis синтезирует инозин-5′-фосфат, за счет которого образуются другие нуклеотиды и свободные пурины. В свою очередь последние под влиянием особых ферментных систем могут вовлекаться в обмен с образованием соответствующих нуклеозидов или нуклеотидов. Что касается пиримидинов, то центральное место в их синтезе должен занимать уридин-5′-фосфат — источник прочих пиримидиновых нуклеотидов и свободных оснований (Дж. Бьюкенен, 1962, и др.).

Таким образом, гипотеза о сходстве путей образования азотистых оснований Y. pestis и прочими организмами значительную роль отводит взаимопревращению одних компонентов нуклеиновых кислот в другие, причем подобное взаимопревращение по существу объединяет два главных направления метаболизма — образование и распад азотистых оснований и их производных. Может быть, именно поэтому Y. pestis обычно не использует их в качестве источников углерода и азота или для энергетических целей.

Приведенные факты позволяют думать, что Y. pestis обладает способностью ассимилировать готовые азотистые основания или их производные, и доказательство этого может помочь расшифровать детали метаболизма нуклеиновых кислот. Мы располагаем подобными данными, к рассмотрению которых и переходим.

Выше уже указывалось, что в процессе роста Y. pestis на синтетических средах в них уменьшается со-

держание азотистых оснований и их нуклеозидов, т. е. происходит процесс, который следует трактовать как результат утилизации оснований для синтеза нуклеиновых кислот. Более убедительные сведения об использовании готовых пуринов — аденина и гуанина — и тимина получены Е. П. Голубинским (1965) в условиях подавления синтеза их de novo с помощью п-аминобензойной кислоты или сульфатиазола. Как показали опыты, рост Y. pestis на синтетических средах в присутствии ингибиторов был возможен только при совместном добавлении к ним смеси аденина, гуанина и тимина или аденозина, гуанозина и тимина (в последнем случае рост был слабее). Каждое из этих соединений взятое в отдельности роста не обеспечивало. На основании изложенного Е. П. Голубинский сделал дополнительный вывод о том, что Y. pestis не способна катализировать реакции аденин⇄гуанин или аденозин⇄гуанозин.

Дальнейшие сведения об утилизации микробом экзогенных азотистых оснований и их производных имеются в работах Воусе с сотр. (1964) и В. Г. Майского (1967б, 1968). Воусе с сотр. установили, что Y. pestis поглощает 8-C^{14}-гуанин и 2-C^{14}-урацил и включает их в состав нуклеиновых кислот. Поглощение гуанина составляло 60,3% от количества основания, добавленного к среде, урацил же утилизировался в 7,4 раза слабее. Тем не менее радиоактивность нуклеиновых кислот в обоих случаях была примерно одинаковой — 80% всей радиоактивности клеток.

По данным В. Г. Майского, Y. pestis для целей синтеза нуклеиновых кислот использует не только гуанин и урацил, но и 8-C^{14}-аденин и 2-C^{14}-цитозин. Радиоактивность добавленного аденина обнаруживалась лишь в аденине, а гуанина — преимущественно в гуанине РНК и ДНК; только небольшая часть метки гуанина переходила в аденин. На основании этого В. Г. Майский постулирует неспособность Y. pestis превращать экзогенный аденин в гуанин (исключения см. ниже) и очень слабую способность его осуществлять обратный процесс. Помимо указанных выше азотистых оснований, микроб утилизирует 8-C^{14}-гипоксантин и 8-C^{14}-ксантин. Радиоактивность первого распределяется примерно поровну между аденином и гуанином обеих нуклеиновых кислот, второго — обнаруживается в основном в гуани-

не (на долю аденина приходилось лишь около 10% всей метки). Результаты этих опытов, во-первых, подтверждают высказанную ранее гипотезу об общности путей синтеза пуринового ядра у Y. pestis и других организмов, а во-вторых, указывают на возможность образования гуанина за счет превращения гипоксантина в ксантин. Появление метки ксантина в аденине скорее всего связано с частичным превращением ксантина в гипоксантин, хотя в общем равновесие реакции гипоксантин⇄ксантин, по-видимому, сдвинуто вправо. Обратимостью этой же реакции можно было бы объяснить и появление метки гуанина в аденине.

До сих пор мы говорили о том, что у Y. pestis не происходит превращения аденина в гуанин (блок на этапе аденин→гипоксантин). Тем не менее, опять-таки на основании данных В. Г. Майского (1967б), полностью отрицать возможность превращения аденина в гуанин нельзя. При выращивании микроба на синтетической среде без гистидина около 40% радиоактивности C^{14}-аденина В. Г. Майский обнаружил в гуанине нуклеиновых кислот. На средах же с гистидином — а именно они применялись в предыдущих опытах Е. П. Голубинского (1965) и В. Г. Майского (1967а) — перехода аденина в гуанин не наблюдалось. Исходя из сказанного, В. Г. Майский считает, что для Y. pestis доступен путь превращения аденина в гуанин через АМФ, АТФ и 5-амино-4-имидазолкарбоксамидриботид. Указанный путь реализуется при синтезе гистидина и может им ингибироваться. Мутанты Y. pestis his^- не в состоянии превращать аденин в гуанин и в отсутствие гистидина (В. Г. Майский, Ю. Г. Сучков, 1970). В недавно опубликованной статье Brubaker (1970) показаны различия во взаимопревращениях аденина и гуанина в зависимости от пигментообразования клеток и условий их культивирования. Так, клоновые P^+-культуры штамма KIM-10 при росте на минимальной среде не способны превращать 8-C^{14}-гуанин в аденин полинуклеотидов; эти реакции имели место на обогащенной среде, которая, однако, не способствовала пигментации колоний. Клетки P^- осуществляли указанные превращения независимо от условий роста. Что касается урацила и цитозина, то они легко превращаются один в другой, а также в тимин. Переход обоих пиримидиновых оснований в тимин является необратимым процессом, так как ра-

5 Заказ № 6541

диоактивный углерод тимина в составе цитозина и урацила Y. pestis не обнаруживается. Больше того, по данным В. Г. Майского (1965а), Y. pestis вообще не включает экзогенный тимин в состав ДНК, что в некоторой степени противоречит результатам исследования Е. П. Голубинского (1965). Однако опыты Е. П. Голубинского с тимином не совсем убедительны, поскольку в них был упущен важный контроль: выяснение возможности роста Y. pestis на средах без тимина.

Об источниках аминогрупп для синтеза гуанина и аденина из ксантина и гипоксантина пока ничего определенного сказать нельзя. То же относится к цитозину. Можно лишь предполагать, что ими являются ионы аммония, а энергия для аминирования соответствующих соединений получается за счет АТФ (у животных для аминирования используется глютамин).

Еще менее ясен вопрос о происхождении метильной группы тимина.

Изучением механизма образования Y. pestis нуклеозидов и нуклеотидов, насколько нам известно, до сих пор специально не занимались. Поэтому в случае утилизации ею экзогенных оснований трудно решить, происходят ли все описанные выше превращения на уровне свободных оснований или трансформация их осуществляется после синтеза тех или иных нуклеотидов.

Итак, мы видим, что Y. pestis может синтезировать нуклеиновые кислоты de novo и использовать для их образования экзогенные азотистые основания. В связи с этим возникает вопрос, каково влияние экзогенных оснований на синтез нуклеиновых кислот.

Согласно данным В. Г. Майского (1967б), включение C^{14}-формиата в клетки Y. pestis значительно подавляется при добавлении к среде пуриновых оснований или их производных. Например, гипоксантин подавлял включение метки формиата на 80%, не влияя в то же время на скорость синтеза нуклеиновых кислот и распределение метки между аденином и гуанином. Очевидно, именно наличием уже предобразованных азотистых оснований в среде Хоттингера объясняется намного более низкая радиоактивность нуклеиновых кислот Y. pestis по сравнению с радиоактивностью нуклеиновых кислот возбудителя, выращенного на синтетической среде. Сказанное можно трактовать как подавление экзогенными пуринами их синтеза de novo (к сожале-

нию, аналогичные сведения о влиянии экзогенных пиримидинов на их синтез из соответствующих предшественников еще отсутствуют). Помимо свободных пуринов, на включение C^{14}-формиата в нуклеиновые кислоты отрицательное влияние в той или иной мере оказывают пуриннуклеотиды — АМФ, АТФ и ГМФ.

Несмотря на то что экзогенные пурины и пуриннуклеотиды подавляют синтез нуклеиновых кислот из их предшественников, полностью этот процесс не прекращается. Однако дать сейчас точную характеристику количественного соотношения между синтезом НК de novo и за счет предобразованных пуринов мы не можем. Не менее трудно оценить и вторую сторону проблемы — соотношение между использованием пуринов, добавленных к среде, и утилизаций эндогенного (внутриклеточного) фонда этих соединений. Соответствующие данные весьма разрозненны и во многом дискутабельны.

Таблица 7

Влияние пуринов и пуриннуклеотидов на усвоение 8-C^{14}-аденина Y. pestis (В. Г. Майский, 1968)

Добавка к среде	УА[1] бактерий (в имп/мин×мг×10^{-3})	ОУА[2] аденина		
		всей РНК	вновь синтезированной РНК	всей ДНК
—	109,5	38,6	80,3	5,2
Аденин	53,6	20,2	49,3	3,0
Гуанин	105,1	34,8	71,4	10,5
Ксантин	101,4	35,5	67,6	6,2
Гипоксантин	109,5	34,7	75,3	6,8
АМФ	94,6	31,6	63,2	6,0
АДФ	114,5	40,3	85,0	6,9
АТФ	90,4	36,1	70,4	4,7

[1] УА — удельная активность.
[2] ОУА — относительная удельная активность.

$$ОУА = \frac{имп/мин \cdot мкмоль\ аденина\ НК}{имп/мин \cdot мкмоль\ экзогенного\ C^{14}\text{-аденина}} \times 100.$$

Как видно из табл. 7, при разбавлении меченого аденина в 2 раза (за счет добавок других соединений) соответствено уменьшается и удельная активность аденина нуклеиновых кислот. По мнению В. Г. Майского,

это говорит о том, что в клетках Y. pestis отсутствует или крайне мал эндогенный фонд свободного аденина. Больше того, исходя из значений коэффициента ОУА, автор приходит к следующему выводу: «Экзогенный аденин, легко включаясь в аденин нуклеиновых кислот, подавляет почти полностью другие пути синтеза аденина полинуклеотидов, в том числе и использование внутриклеточного фонда предшественников».

Иная картина отмечалась в случае опытов с меченым гуанином. Исходя из того, что почти вся метка экзогенного гуанина была сосредоточена в гуанине нуклеиновых кислот, В. Г. Майский пришел к заключению о преимущественном синтезе аденина в этом случае из простых соединений или использовании его из эндогенного фонда.

Различие в превращениях аденина в гуанин связано, как считают Е. П. Голубинский (1965), В. Г. Майский, Ю. Г. Сучков (1970), Brubaker (1970), с отсутствием у чумного микроба адениндезаминазы.

Интересно отметить, что введение в среду выращивания аденина, а также гипоксантина и ГМФ в значительной мере подавляло включение метки ксантина в аденин. Экзогенные гуанин, гипоксантин и ГМФ ингибировали превращение ксантина в гуанин.

Изучение влияния добавок различных пиримидинов и их производных на включение в нуклеиновые кислоты меченых пиримидинов мало что дало для ответа на вопрос о соотношении между использованием экзогенных и эндогенных пиримидинов. В основном оно подтвердило лишь описанные выше факты по взаимопревращению пиримидинов. Кроме того, было установлено, что соответствующие экзогенные нуклеозидтрифосфаты, по-видимому, вследствие неспособности клеток к их утилизации в синтезе нуклеиновых кислот Y. pestis участия не принимают. В то же время удалось показать включение в ДНК тимина из экзогенного тимидина, хотя сам по себе экзогенный тимин (как указывалось) микробом не усваивается.

Обо всех деталях регуляции образования пуриновых нуклеотидов у Y. pestis читатель может узнать из статьи М. Л. Беккера (1967), а общие аспекты проблемы синтеза РНК и ДНК освещены в его диссертации (1965), а также в работе Gadgil с сотр. (1967b).

Обмен углеводов. Вследствие использования «пестрых» рядов для дифференциации бактерий отношение Y. pestis к углеводам и родственным соединениям служит предметом тщательного изучения уже на протяжении многих лет. Результаты этого изучения представлены в табл. 8.

Таблица 8

Ферментация Y. pestis некоторых углеводов и спиртов (по И. В. Домарадскому, 1971)

Субстрат	Ферментация до кислоты без газа	Субстрат	Ферментация до кислоты без газа
Арабиноза	Чаще есть	Маннит	Обычно есть
Галактоза	» »	Манноза	Есть
Гликоген	Есть	Мелибиоза	Нет
Глицерин	Чаще есть	Мелецитоза	»
Глюкоза	Есть	Рамноза	Обычно нет
Декстрин	Чаще есть	Раффиноза	Нет
Дульцит	Обычно нет	Салицин	Чаще есть
Инозин	Нет	Сахароза	Обычно нет
Инулин	Обычно нет	Сорбит	Нет
Ксилоза	Чаще есть	Фруктоза	Есть
Лактоза	Обычно нет	Целлобиоза	Нет
Мальтоза	Обычно есть	Эскулин	Есть

Как видно из таблицы, Y. pestis расщепляет до кислоты без газа относительно большое число различных соединений, включая некоторые полисахариды, гликозиды и многоатомные спирты. Однако установить какую-либо закономерность между способностью Y. pestis расщеплять углеводы и их производные и физико-химическими свойствами этих соединений (в частности, структурой) пока не удается. Поэтому предсказать заранее, как будет вести себя микроб в отношении многочисленных новых соединений, которые сейчас выделяются или синтезируются, практически нельзя.

О расщеплении углеводов и близких к ним соединений можно судить не только по образованию кислоты, как обычно делают бактериологи, но также по их окислению. Соответствующие данные имеются в табл. 9. Кроме того, в ней представлены сведения об окислении Y. pestis некоторых органических кислот. Правда, данные получены при работе лишь с одним штаммом океанического происхождения, поэтому их ценность ограничена. Тем не менее из табл. 8 и 9 можно видеть,

Таблица 9

Окисление Y. pestis некоторых субстратов (по Rao, 1940a)

Субстрат	Q_{O_2}	Субстрат	Q_{O_2}
Манноза	36,1	Глицерин	0
Глюкоза	35,8	Муравьиная кислота	0
Фруктоза	34,6	Пропионовая »	0
Галактоза	31,5	Масляная »	0
Гексозодифосфат	28,5	Этиловый спирт	2,61
Мальтоза	27,4	Тартроновая кислота	2,52
Пировиноградная кислота	21,6	Рамноза	2,43
		Ксилоза	1,59
Маннит	18,1	Сахароза	1,56
Уксусная кислота	11,0	Дульцит	1,19
Фумаровая »	10,3	Раффиноза	0
Малоновая »	9,85	Сорбит	0
Янтарная »	7,3	Капроновая кислота	0
Арабиноза »	4,9		

что в общем между способностью Y. pestis окислять те или иные углеводы и образовывать из них кислоту существует определенный параллелизм.

Недавно получены материалы, свидетельствующие о расщеплении в культурах Y. pestis некоторых гликозидов (С. П. Меринов и др., 1971).

Универсальный и в то же время филогенетически наиболее древний путь распада углеводов — сбраживание глюкозы по схеме Эмбдена—Мейергофа—Парнаса, или гликолиз. Катаболизм других углеводов и близких к ним соединений обычно начинается с превращения их в субстраты, доступные брожению по этой схеме. Распад углеводов у Y. pestis не составляет исключения.

Одним из показателей наличия гликолиза являются результаты анализа конечных продуктов диссимиляции углеводов. Такой анализ на примере Y. pestis проводили многие авторы.

По данным Doudoroff (1943), в культуре Y. pestis, растущей в анаэробных условиях, из числа продуктов распада глюкозы и маннита основная масса приходится на долю лактата, ацетата и этанола. В значительно меньших количествах обнаруживаются пируват, сукцинат, формиат и CO_2, а также следы ацетилметилкарбинола. Doudoroff обратил внимание на то, что соотно-

шение двууглеродных и одноуглеродных соединений необычно велико — 3,2. Это можно объяснить или своеобразием окислительно-восстановительных процессов у Y. pestis (см. конец главы), или недостаточно полным определением всех одноуглеродных соединений.

Как установили Н. Н. Ивановский и В. С. Башева (1951а), при росте на бульоне (относительно анаэробные условия) с глюкозой Y. pestis образует кислоты. Из них 10% приходится на летучие, среди которых превалирует масляная кислота, идентифицированная по кальциевой соли и этиловому эфиру. Из нелетучих кислот качественными пробами установлено присутствие яблочной и лимонной.

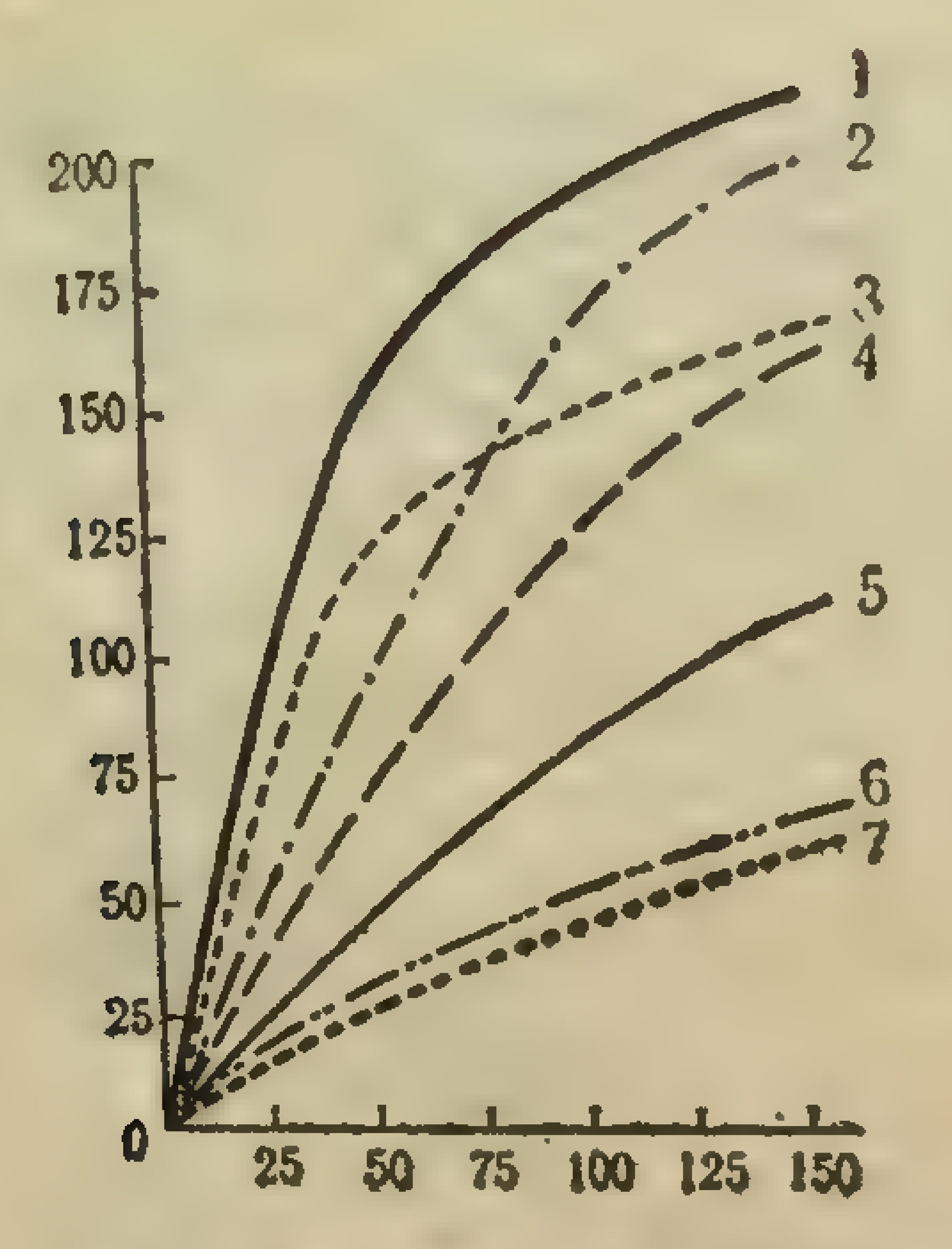
В опытах Santer и Ajl (1955a) основными продуктами брожения глюкозы под влиянием покоящихся клеток были лактат, ацетат, формиат и этанол, а также CO_2. Сукцинат и пируват обнаруживались только в следовых количествах. При сбраживании рибозы в основном накапливались ацетат, формиат и этанол.

«Набор» продуктов диссимиляции глюкозы и родственных соединений меняется в зависимости от того, в каких условиях выращивают культуру и как ставят опыты. Это особенно наглядно показано Englesberg с

Таблица 10

Диссимиляция глюкозы клетками Y. pestis, выращенными в аэробных и анаэробных условиях (по материалам Englesberg с сотр., 1954)

Продукты диссимиляции	Количество образованного продукта в молях на 100 молей диссимилированной глюкозы		
	в присутствии O_2 клетками, выращенными аэробно	в присутствии O_2 клетками, выращенными анаэробно	без O_2 клетками, выращенными анаэробно
CO_2	292	95	35
Этанол	0	15	103
Пируват	6	57	11
Лактат	10	15	36
Ацетат	3	11	31
Формиат	—	21	104
Ацетоин	0	Следы	1
Сукцинат	0	0	5



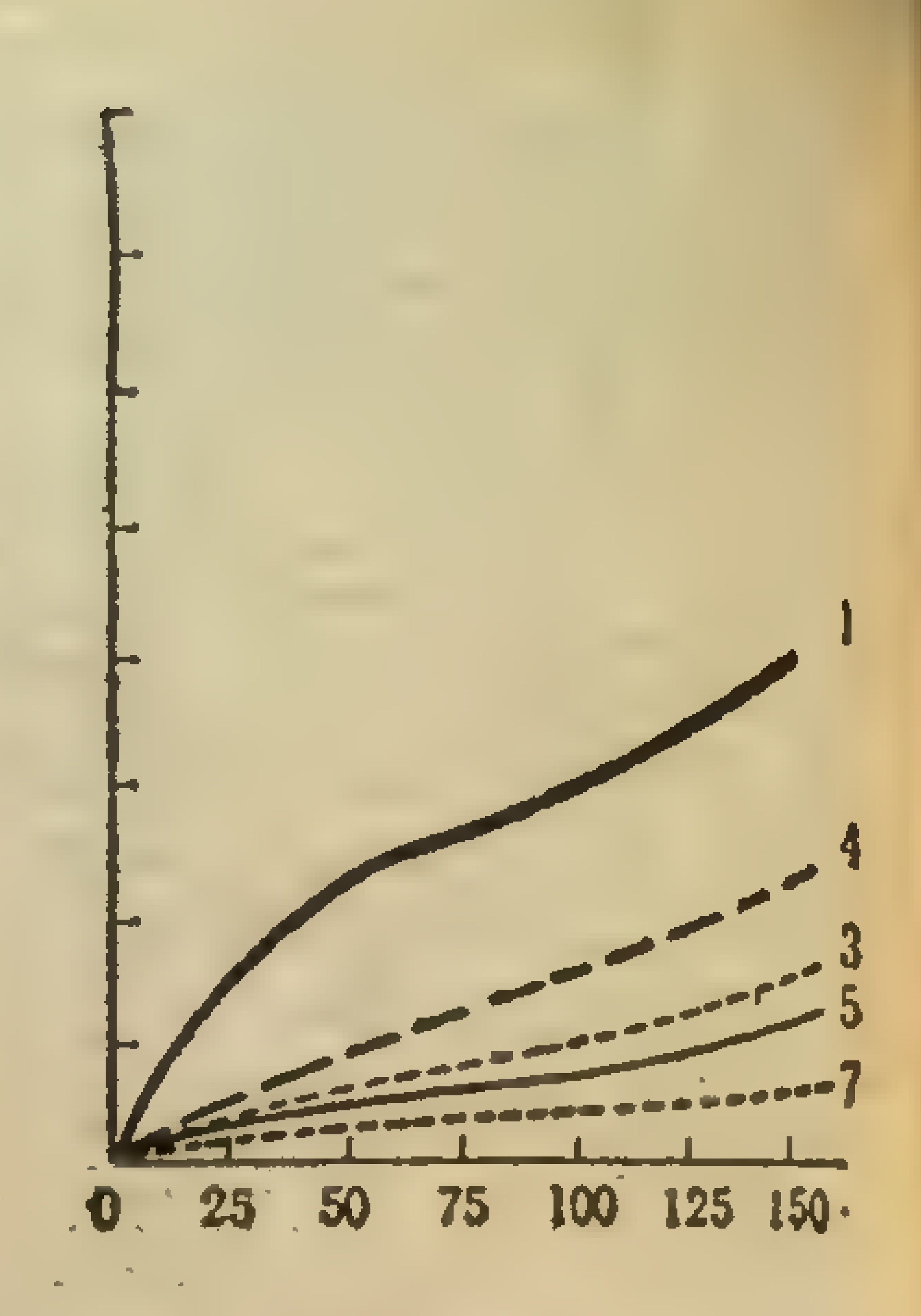


Рис. 1. Окислительный метаболизм у аэробно (слева) и анаэробно (справа) выращенных клеток Y. pestis (E. Englesberg e. a., 1954). По оси ординат — поглощение кислорода, мкл; по оси абсцисс — время, мин.

1 — глюкоза; 2 — ацетат; 3 — пируват; 4 — сукцинат; 5 — фумарат, малат; 6 — α-кетоглютарат; 7 — цитрат и без субстрата (у аэробно выращенных клеток), цитрат, ацетат и без субстрата (у анаэробно выращенных клеток).

сотр. (1954). Когда клетки выращивали в аэробных условиях и опыты проводили при аэрации, основным продуктом распада глюкозы являлась CO_2, а лактат накапливался лишь в небольших количествах. Если же клетки выращивали в анаэробных условиях, то при распаде глюкозы, помимо CO_2, обнаруживали этанол, следы ацетоина и кислоты — пируват, лактат, ацетат и формиат. «Анаэробные» культуры давали меньше CO_2 и соответственно больше эталона, формиата, лактата и ацетата в анаэробных условиях, чем в аэробных (табл. 10).

Различия в метаболизме глюкозы «аэробными» и «анаэробными» культурами объясняются отсутствием у последних способности к окислению ацетата и слабой способностью окислять пируват, сукцинат, фумарат и малат (рис. 1). Однако это различие может быть устранено, если «анаэробные» культуры подвергать аэрации в течение нескольких часов в среде из гидролизата казеина с глюкозой. Поскольку «адаптация» угнетается ультрафиолетом, Englesberg с сотр. считают, что аэрация выступает в роли индуктора соответствующих оксидоредуктаз.

На наличие механизма гликолиза может указывать не только результат анализа продуктов распада углеводов, но и характер распределения метки в метаболитах при использовании для опытов радиоактивной глюкозы. Такого рода опыты были поставлены Santer и Ajl (1955a). По их данным, радиоактивный углерод 1-C^{14}-глюкозы выявлялся в лактате, ацетате, этаноле и сукцинате и отсутствовал в формиате; CO_2 отличалась крайне слабой радиоактивностью. Особенно важно, что удельная радиоактивность сукцината составляла половину удельной радиоактивности C^{14}-глюкозы. Последнее возможно только в том случае, если молекула глюкозы распадается на две триозы, из которых меткой обладает лишь одна.

Сказанное предполагает наличие у Y. pestis всех ферментов, необходимых для гликолиза. К сожалению, из их числа в прямых опытах выявлены лишь глюкокиназа, фосфофруктокиназа (А. В. Наумов, 1970; Santer, Ajl, 1955b) и альдолаза фруктозо-1,6-дифосфата (И. В. Домарадский, И. М. Климова, 1964; Б. Н. Мишанькин, 1968; Santer, Ajl, 1955b). Кроме того, показано присутствие гликозидаз (И. М. Климова и др., 1967; С. П. Меринов и др., 1971; Martin, Jacob, 1962), «подготавливающих» соответствующие субстраты для гликолиза.

Как известно, процесс брожения подавляется дыханием (эффект Пастера). Однако из этого правила нередки исключения, когда гликолиз происходит в присутствии кислорода (аэробный гликолиз). Судя по данным, изложенным выше, аэробный гликолиз присущ и Y. pestis. Поскольку при аэробном гликолизе образуется больше энергии, чем при брожении углеводов в анаэробных условиях, в присутствии кислорода микроб разлагает примерно вдвое меньше глюкозы (Ф. К. Дроздовская, 1962). Соответственно увеличивается количество окисленных продуктов, в частности CO_2 (Doudoroff, 1943). При этом не последнюю роль, по-видимому, играет индукция кислородом оксидоредуктаз, о которой уже говорилось.

Помимо гликолиза, существуют другие пути распада углеводов, среди которых видное место занимает полное окисление моносахаридов до двуокиси углерода с промежуточным образованием пентозо- и гептозофосфатов (гексозомонофосфатный шунт, или схема Вар-

бурга—Диккенса). Выявлению гексозомонофосфатного шунта у Y. pestis посвящено несколько работ.

Первоначально Santer и Ajl (1955a) на основании результатов изучения распределения метки в продуктах распада 1-C^{14}-глюкозы пришли к выводу о том, что у Y. pestis этот шунт не функционирует. Однако затем они были вынуждены пересмотреть свои взгляды. Основанием послужила установленная ими же способность лиофилизированных клеток микроба окислять глюконат (его производное — 6-фосфоглюконат — является одним из звеньев шунта).

Для выяснения истинного положения дела Santer и Ajl (1955b) несколько изменили условия постановки опытов с 1-C^{14}-глюкозой: помимо покоящихся клеток, как было ранее, они использовали также растущие клетки и заменили анаэробные условия аэробными. При этом оказалось, что удельная радиоактивность CO_2, выделяемой растущими клетками, почти в 3,7 раза выше, чем радиоактивность CO_2, образуемой покоящимися клетками (прямое указание на превращение в CO_2 первого атома углерода меченой глюкозы, характерное для гексозомонофосфатного шунта). Однако со временем разница в удельной радиоактивности CO_2, выделяемой клетками обоих типов, постепенно стиралась, так как уменьшалась интенсивность роста, и растущие клетки становились подобными покоящимся. Последнее явилось поводом для заключения о наличии у Y. pestis двух путей распада глюкозы, один из которых — гликолитический — реализуется как у растущих, так и покоящихся клеток, а второй — гексозомонофосфатный — только у растущих.

Дополнительные доказательства наличия у Y. pestis гексозомонофосфатного шунта были получены Santer и Ajl (1955b) путем выявления ключевого фермента альтернативного пути распада углеводов — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, зависимой от НАДФ (но не НАД), и образования пентозо-5-фосфата. Интересно отметить следующее. Экстракты из клеток Y. pestis быстро метаболизируют как фруктозо-1,6-дифосфат, так и рибозо-5-фосфат, причем в обоих случаях накапливаются фосфотриозы.

Кроме того, при распаде рибозо-5-фосфата обнаруживается C_2-компонент, предположительно гликольальдегид.

К сожалению, на вопрос о том, почему гексозомонофосфатный шунт функционирует только у растущих клеток, Santer и Ajl ответа не дали.

Несколько иные результаты представлены в вышедшей недавно работе Б. Д. Рублева и Е. П. Голубинского (1971). Исследуя пути распада глюкозы в растущих культурах Y. pestis и применяя в отличие от Santer и Ajl в радиореспирометрических опытах 1-C^{14}- и 6-C^{14}-глюкозу, они приходят к выводу, что основным путем распада углеводов является схема Эмбдена—Мейергофа. Доля апотомического пути незначительна. Иной выход меченой CO_2 в опытах Santer и Ajl авторы объясняют неодинаковой глубиной распада 1-C^{14}-глюкозы у растущих и покоящихся клеток. Интересно, что у псевдотуберкулезного микроба и у измененного штамма Y. pestis ЖBR, помимо гликолитического пути, активно функционирует и глюкозомонофосфатный шунт; активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы коррелировала с интенсивностью образования меченой CO_2 из 1-C^{14}-глюкозы, условия культивирования существенно не влияли на характер распада 1-C^{14}- и 6-C^{14}-глюкозы.

Данные Б. Д. Рублева и Е. П. Голубинского согласуются с результатами исследований Mortlock (1962). В частности, он также показал, что покоящиеся клетки Y. pestis расщепляют глюкозу по схеме Эмбдена—Мейергофа—Парнаса, даже если их выращивают на среде с глюконатом. В то же время он не смог показать наличие глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, хотя у возбудителя псевдотуберкулеза она была обнаружена. Последнее Mortlock и Brubaker (1962) рассматривают как признак, имеющий значение для таксономии этих двух микроорганизмов. К выводу об отсутствии у штамма EV глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы пришел также А. В. Наумов (1970), хотя у его мутантов, один из которых автор называет «новообразованным из культуры EV псевдотуберкулезным штаммом», фермент имелся. Чем объяснить причину расхождения данных Santer и Ajl, с одной стороны, и прочих исследователей — с другой, пока сказать трудно. Возвращаясь к работе Mortlock, надо указать, что цель ее сводилась в основном к изучению метаболизма глюконата.

Предпосылкой к этому явились данные Lawton и Surgalla и Naylor с сотр. (цит. по Mortlock, 1962) о по-

ложительном влиянии глюконата на вирулентность Y. pestis.

Mortlock установил, что заметная скорость окисления глюконата покоящимися клетками отмечается только в тех случаях, когда их выращивают на среде с глюконатом[1]. Помимо глюконата, такие клетки окисляют рибозу и глюкозу. После разрушения клеток экстракты из них приобретают способность окислять глюконат, глюкозу, рибозо-5-фосфат, глюкозо-6-фосфат и 6-фосфоглюконат, но не рибозу. Аналогичную картину Mortlock наблюдал при использовании экстрактов из клеток со среды с глюкозой. Отличие заключалось только в соотношении скорости диссимиляции тех или иных субстратов и неспособности экстрактов из клеток со среды с глюкозой (как и цельных клеток) окислять глюконат. По мнению Mortlock (1962), при разрушении клеток происходит инактивация рибокиназы; глюконокиназа же если и инактивируется, то в очень небольшой степени (во всяком случае ее активность в обоих экстрактах была одинаковой)[2].

Экстракты из «глюконатных» клеток содержали 6-фосфо-D-глюконат: НАДФ-оксидоредуктазу, которая дегидрировала как 6-фосфоглюконат, так и глюконат в присутствии АТФ. На глюкозу, глюкозу+АТФ, глюкозо-6-фосфат, рибозу и рибозо-5-фосфат фермент не действовал. В экстрактах из «глюкозных» клеток фосфоглюконатдегидрогеназа также обнаруживалась, но активность ее обычно была ниже. Кроме того, в экстрактах присутствовала транскетолаза. На это указывало, во-первых, восстановление глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназной НАД при добавлении к экстрактам рибозо-5-фосфата, а во-вторых, идентификация седогептулезо-7-фосфата при распаде 6-фосфоглюконата. С другой стороны, образование глицеральдегид-3-фосфата за

---

[1] К аналогичному заключению одновременно пришли Fukui с сотр. (1962). Они подметили также, что глюконат окисляется клетками, выращенными in vivo, хотя объяснения последнему факту не дали.

[2] Исходя из этого, трудно понять, почему экстракты из клеток со среды с глюкозой не метаболизируют свободный глюконат. Может быть, все-таки активность глюконокиназы при разрушении указанных клеток повреждается сильнее, чем думает Mortlock? С другой стороны, если клетки со среды с глюкозой образуют глюконокиназу (подобно клеткам со среды с глюконатом), то почему они практически не окисляют глюконат, как и экстракты из них?

счет рибозо-5-фосфата и седогептулезо-7-фосфата из 6-фосфоглюконата говорило о наличии в экстрактах рибулезофосфат-3-эпимеразы и рибозофосфатизомеразы, катализирующих взаимное превращение ксилулезо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата в рибулезо-5-фосфат — конечный продукт окислительного декарбоксилирования 6-фосфоглюконата описанной выше НАДФ-зависимой дегидрогеназой.

Приведенные факты в сочетании с высокой удельной активностью CO_2, возникающей при окислении 1-C^{14}-глюконата, свидетельствуют о способности Y. pestis осуществлять распад глюконата по схеме Варбурга—Диккенса. Поскольку все реакции гексозомонофосфатного шунта обратимы, Mortlock считает, что даже при отсутствии у Y. pestis глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы она может синтезировать пентозы, необходимые для построения нуклеиновых кислот с помощью транскетолазы и трансальдолазы из фруктозо-6-фосфата и фосфотриоз. Тем самым постулируется возможность постоянного функционирования у Y. pestis «неокисляющей» части гексозомонофосфатного шунта, даже если микроб выращивают на средах без глюконата; вопрос же об «окисляющей» части шунта в связи с противоречивыми сведениями о наличии у Y. pestis глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы нуждается в уточнении. Однако процесс образования пентоз все-таки более интенсивен в присутствии глюконата, чем Mortlock и объясняет его положительное влияние на рост вирулентных клеток.

Недавно А. В. Наумов (1970) показал наличие у Y. pestis глюкозодегидрогеназы и глюконаткиназы. По его мнению, фосфоглюконат, образованный из глюкозы под влиянием перечисленных ферментов, подвергаясь дальнейшим превращениям, в конечном итоге может давать рибозо-5-фосфат.

Ряд данных, полученных Mortlock, свидетельствует о способности Y. pestis расщеплять глюконат еще одним путем, а именно по схеме Энтнера—Дудорова. В пользу этого говорит, например, превращение 6-фосфо-2-кето-3-дезоксиглюконата в глицеральдегид-3-фосфат и 6-фосфоглюконата (без его декарбоксилирования) в пируват. Нами в сотрудничестве с Б. Д. Рублевым (Б. Д. Рублев и др., 1971) при исследовании метаболизма глюконата у Y. pestis получены результаты, подтверждающие такой вывод, в частности показано,

что при декарбоксилировании пирувата, образованного из 1-C^{14}-глюконата, выделяется значительно больше радиоактивной CO_2, чем при освобождении CO_2 из пирувата, обязанного своим происхождением 1-C^{14}-глюкозе. Обращает на себя внимание и то обстоятельство, что в данных условиях для превращения глюконата в фосфоглицеральдегид не требуется НАДФ (Б. Д. Рублев, 1973).

В отношении локализации ферментов углеводного обмена известно, что большинство из них содержится как во фракции мембран, так и в цитоплазме бактериальной клетки. Однако гексокиназа и фосфофруктокиназа сосредоточены главным образом в цитоплазме, а ферменты, участвующие в дегидрировании 5-кетоглюконата, сукцината и лактата,— в мембранных образованиях (Е. П. Голубинский, В. И. Борзенкова, 1970; А. В. Наумов, 1970).

Все сказанное ставит Y. pestis в один ряд с другими высокоактивными микроорганизмами.

В связи с проблемами метаболизма углеводов нам остается рассмотреть еще два вопроса, которые тесно связаны с таксономией. Мы имеем в виду отношение Y. pestis к глицерину и рамнозе. Особый интерес представляет действие микроба на глицерин. Как известно, по этому признаку различают две его разновидности — глицериннегативную и глицеринпозитивную. В подавляющем большинстве случаев глицериннегативные варианты выделяются в тех районах, где хранителями чумы являются крысы и их блохи (океанические штаммы). Чаще всего они встречаются в районах Тропической Африки и Юго-Восточной Азии. Глицеринпозитивные варианты Y. pestis обычно выделяются от сусликов, сурков и песчанок (и их блох). В связи с этим распространение глицеринпозитивной разновидности географически связано с ареалом указанных видов грызунов (континентальные штаммы). Таким образом, отношение Y. pestis к глицерину до известной степени характеризует происхождение штаммов.

Надо отметить также, что океанические штаммы отличаются от континентальных не только неспособностью ферментировать глицерин. Они характеризуются несколько иной антигенной структурой, очень редко разлагают рамнозу, среди них обычно не встречаются уреазопозитивные варианты, и их штаммы более требова-

тельны к набору питательных веществ (в частности, аминокислот).

Внешняя среда контролирует и обусловливает определенный тип обмена веществ популяции микробов. Для Y. pestis внешней средой является организм грызуна или блохи, в которых она паразитирует. Естественно поэтому, что многие исследователи пытались объяснить причину («генез») появления глицеринпозитивных штаммов, исходя из особенностей метаболизма их хозяина.

По теории В. М. Туманского (1958), появление у Y. pestis способности разлагать глицерин связано с временным пребыванием ее в организме зимоспящих грызунов, которые играют большую роль в поддержании очаговости чумы в ряде районов СССР, Монголии и Китая. К моменту залегания в спячку в организме грызунов откладывается большое количество жира. В результате утилизации макроорганизмом жира в качестве промежуточного продукта его распада образуется глицерин. Если в этот период Y. pestis попадает в организм грызуна, она длительное время сохраняется в среде, богатой глицерином, и приобретает способность ферментировать его.

Однако теория В. М. Туманского имеет два больших недостатка. Во-первых, она не объясняет причины сохранения у микроба способности к ферментации глицерина в тех случаях, когда он через посредство блохи (или в экспериментальных условиях) попадает в организм незимоспящих грызунов. Во-вторых, согласно нашим данным (см. ниже), у всех штаммов Y. pestis отсутствует липаза, поэтому даже в организме спящего грызуна она может использовать только глицерин, образующийся в результате деятельности ферментов самого хозяина. Но трудно предположить, чтобы в организме спящего грызуна концентрация глицерина была намного выше той, которая имеется в активном периоде жизни животного или у незимоспящего грызуна.

Несколько иначе к решению вопроса подходит Н. Н. Ивановский (1951). Он считает, что отношение Y. pestis к глицерину зависит от типа дыхания грызуна-носителя. Спячка грызуна сопровождается (или обусловливается) снижением интенсивности обмена веществ. Возникает явление гипоксии. Следовательно, микроб в организме спящего грызуна находится в условиях недостаточного притока кислорода. Результатом

этого является повышение «активности бродильных процессов», отражающееся на глицерине. В организме незимоспящих грызунов, интенсивно дышащих, Y. pestis, по мнению Н. Н. Ивановского, отличается более аэробным типом дыхания и пониженной бродильной активностью; отсюда неспособность ее ферментировать глицерин.

Теория Н. Н. Ивановского также не дает ответа на вопрос о причине наличия у Y. pestis способности разлагать глицерин при условии существования микроба в организме незимоспящих грызунов; не объясняет она и обратное явление, а именно негативное отношение к глицерину океанических штаммов, выделенных от сурков и сусликов, погибших от экспериментальной чумы. Кроме того, остается неясной причина выделения от незимоспящих грызунов одновременно глицериннегативных и глицеринпозитивных штаммов.

Как видно, генез глицеринпозитивных штаммов остается предметом дискуссий. Вместе с тем в механизме ферментации глицерина Y. pestis пока никто разобраться не пытался, а не зная его, нельзя правильно ответить на этот вопрос. Учитывая сказанное, мы решили сначала изучить механизм диссимиляции глицерина в культуре глицеринпозитивного штамма, а затем путем сравнения штаммов, разлагающих и не разлагающих глицерин, выяснить, отсутствие какого фермента (или ферментов) обусловливает неспособность микроба ферментировать глицерин. Поскольку Y. pestis легко сбраживает глюкозу, основное внимание было уделено изучению начальных этапов превращения глицерина до стадии образования фосфотриоз. Некоторые итоги наших опытов (И. В. Домарадский и др., 1968а) приводятся ниже.

Расщепление глицерина под влиянием Y. pestis — в основном аэробный процесс. В анаэробных условиях глицерина распадается примерно в 7 раз меньше, чем в аэробных. Что является акцептором водорода в отсутствие кислорода, пока не выявлено. На 1 моль распадающегося глицерина расходуется в среднем около 1 моля кислорода. Стехиометрически это соответствует превращению его в пировиноградную кислоту. Однако полного перехода глицерина в пируват мы ни разу не наблюдали даже в вероналовом буфере, в котором обычно накапливается больше всего пирувата. Оче-

видно, процесс не останавливается на стадии образования пирувата, а идет дальше, но уже без заметного потребления кислорода. При этом наряду с другими, пока не идентифицированными продуктами, образуется молочная кислота, но количество ее относительно невелико.

Помимо глицерина, Y. pestis окисляет глицерофосфат (α- и β-изомеры), глицеральдегид и значительно слабее диоксиацетон. Последние два субстрата способен также окислять глицериннегативный штамм.

На отношение Y. pestis к отдельным возможным метаболитам глицерина большое влияние оказывает буфер. Так, например, в фосфатном буфере скорость окисления обоих изомеров глицерофосфата почти в 4 раза ниже, чем в вероналовом. Это навело на мысль, что окисляется не глицерофосфат, а глицерин, образующийся при действии на глицерофосфат фосфатазы, активность которой подавляется неорганическим фосфором (И. В. Домарадский и др., 1968а). Кстати, глицериннегативный штамм также дефосфорилирует оба изомера глицерофосфата.

Сказанное вместе с результатами изучения метаболизма глицерина с позиций теории «последовательной индукции» привело нас (И. В. Домарадский и др., 1968б) к гипотезе о том, что первый этап расщепления глицерина Y. pestis сводится не к фосфорилированию, а к окислению его с образованием глицеральдегида. Выявление же глицеральдегида (Н. Л. Лосева, И. В. Домарадский, 1968) подтвердило эту гипотезу.

С позиции указанной гипотезы разницу между глицериннегативными и глицеринпозитивными штаммами можно объяснить отсутствием у первых только одного фермента — глицеролдегидрогеназы[1], а их возникновение — «односайтовой» мутацией.

В дальнейшем В. И. Тыняновой у глицеринпозитивной разновидности чумного микроба были выявлены киназа глицерина и независимая от НАД дегидрогеназа L-α-глицеролфосфата, что свидетельствует о возмож-

---

[1] Не исключено, что от глицерол : НАД-оксидоредуктазы фермент Y. pestis отличается образованием из глицерина именно глицеральдегида, а не диоксиацетона. Указания на наличие такой глицеролдегидрогеназы имеются в «Reports of the commision on Enzymes» (Pergamon Press, 1961; цит. по «Клинической ферментологии», 1966).

6 Заказ № 6541

ном окислении глицерина с участием фосфорной кислоты (В. И. Тынянова, И. В. Домарадский, 1972). Оба фермента распределены в клетке между структурными фракциями и растворимыми. В то же время упомянутая выше глицеролдегидрогеназа оказалась локализованной на структурах.

Энзимы прямого пути распада и распада с участием фосфорной кислоты различны по своей природе. Глицеролдегидрогеназа представляет собой конститутивный фермент, в то время как киназа глицерина и дегидрогеназа глицеролфосфата носят индуцибельный характер. Фактором, регулирующим работу ферментов того или иного направления распада глицерина, является концентрация этого субстрата в среде выращивания. Увеличение количества глицерина в инкубационной среде от 0,01 до 0,5% сопровождается угнетением активности (или подавлением синтеза) глицеролдегидрогеназы и проявлением активности (или синтеза) киназы глицерина и дегидрогеназы глицеролфосфата, что позволяет считать путь распада глицерина через глицеролфосфат основным направлением диссимиляции этого спирта в клетках континентальных штаммов.

В. И. Тынянова показала также, что различие между глицеринпозитивной и глицериннегативной разновидностями заключается в отсутствии у последней не только глицеролдегидрогеназы, но и глицеролкиназы и глицеролфосфатдегидрогеназы. Однако у обеих разновидностей Y. pestis присутствуют ферменты синтеза глицерина.

После того как А. А. Безсонова (1929) предложила среду с рамнозой для дифференциальной диагностики Y. pestis и Y. pseudotuberculosis, отношение Y. pestis к этой пентозе стало предметом многочисленных исследований. Анализируя имеющиеся в литературе данные, а также результаты собственных наблюдений, Н. Н. Ивановский и В. С. Башева (1951б) пришли к выводу, что Y. pestis обладает способностью разлагать рамнозу, причем такое свойство является ее видовым признаком, который в процессе адаптации микроба значительно усиливается и становится легко обнаруживаемым с помощью методики, обычно применяемой в бактериологии. Однако теперь с подобной трактовкой трудно согласиться. Адаптация, о которой говорят Н. Н. Ивановский и В. С. Башева, на самом деле, по-видимому,

представляет собой селекцию рамнозапозитивных мутантов. По данным Englesberg (1957a), рамнозапозитивные мутанты Y. pestis начинают появляться с 6-го дня инкубации с частотой $2{,}6 \cdot 10^{-11}$. Это продолжается до 20-го дня роста. Затем количество мутантов уменьшается.

Как показано далее Englesberg (1957b, c), клетки рамнозапозитивных мутантов окисляют рамнозу только в том случае, если их предварительно выращивают в ее присутствии. При росте же на среде с глюкозой эти клетки в отношении рамнозы первоначально ведут себя подобно клеткам рамнозанегативных штаммов и начинают окислять рамнозу только после 50-минутного контакта с ней; через 2 часа поглощение кислорода достигает максимума (очевидно, в течение первых минут происходит индукция субстратом соответствующих ферментов). Тем не менее рамноза окисляется неполностью, и одним из продуктов ее распада является 2-оксипропионовый альдегид. У «адаптированных» рамнозапозитивных мутантов были обнаружены изомераза рамнозы, катализирующая ее превращение в рамнулозу, и рамнулокиназа, фосфорилирующая рамнулозу с образованием рамнулозо-1-фосфата. Попытки получить мутанты, синтезирующие только один из указанных ферментов, окончились неудачей. Поэтому Englesberg считает, что приобретение штаммом способности образовывать оба фермента — результат мутации лишь одного гена.

Выше мы уже неоднократно указывали на то, что процессы распада углеводов у Y. pestis сопровождаются поглощением кислорода и уменьшением восстановленных соединений среди продуктов распада. Кроме того, приводились данные об индуцировании кислородом ряда оксидоредуктаз. Однако вопросы механизма терминального окисления мы подробно не разбирали, хотя с точки зрения энергетики и связей углеводного обмена аэробных организмов с метаболизмом других соединений они представляют наибольший интерес.

Важнейшим, но не единственным руслом, по которому идет окончательное окисление соответствующих метаболитов клеток, является цикл трикарбоновых кислот, или цикл Кребса. Именно этим путем продукты обмена углеводов, жиров и аминокислот сжигаются до CO_2 и воды, а химическая энергия, освобождающаяся

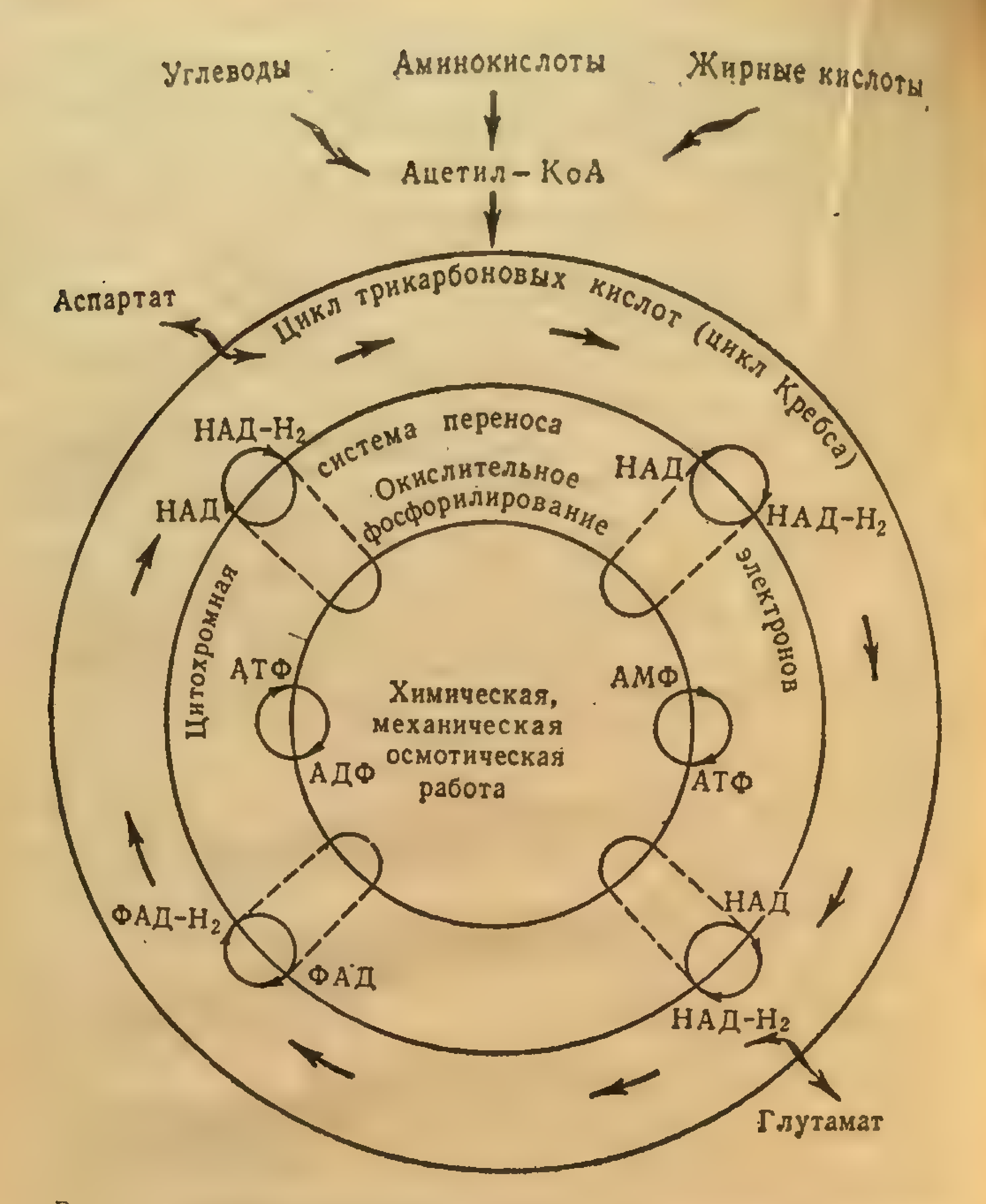


Рис. 2. Схематическое изображение взаимосвязи обмена углеводов. (Bonner J., Varner J., 1968).

при их окислении, частично резервируется в виде макроэргических связей; кроме того, цикл служит основным источником восстановленных коферментов. Необходимо подчеркнуть, что теоретически все реакции цикла Кребса обратимы, благодаря чему и достигается взаимосвязь различных видов обмена (рис. 2).

Цикл трикарбоновых кислот начинается с образования лимонной кислоты, происходящего за счет кон-

денсации ацетил-КоА со щавелевоуксусной кислотой. Насколько пока известно, источниками щавелевоуксусной кислоты у Y. pestis могут являться аспарагиновая кислота и фосфоенолпируват — один из конечных продуктов гликолиза. Образование щавелевоуксусной кислоты за счет аспартата не требует специальных пояснений, об этом говорилось в разделе, посвященном обмену аминокислот. Что касается фосфоенолпирувата, то его превращение в оксалоацетат связано с фиксацией CO_2 и осуществляется двумя путями (Baugh e. a., 1964a):

фосфоенолпируват + CO_2 + H_2O = оксалоацетат + неорганический фосфор,
фосфоенолпируват + CO_2 + АДФ = оксалоацетат + АТФ.

Первый путь катализируется ортофосфат: оксалоацетат-карбоксилазой (фосфорилирующей), второй — ферментом, подобным ГТФ: оксалоацетат-карбоксилазе (трансфосфорилирующей) и отличающимся от нее сродством к АТФ. В обоих случаях мы сталкиваемся со способностью Y. pestis фиксировать CO_2 на уровне фосфоенолпирувата; еще об одной реакции, сопряженной с фиксацией CO_2, также установленной Baugh с сотр. (1964a), мы упоминали, разбирая вопрос о синтезе карбамоилфосфата [1].

В свою очередь одним из источников ацетата для образования ацетил-КоА служит пируват, возникающий при диссимиляции как углеводов, так и других соединений, например аланина или цистеина. Специально распад пирувата изучали Levine с сотр. (1954). Ими установлено, что покоящиеся клетки Y. pestis окисляют пируват полностью, в то время как экстракты из клеток образуют ацетат согласно уравнению: пируват + $^1/_2$ O_2 = ацетат + CO_2. Последнее свидетельствует о наличии у Y. pestis комплекса энзимов типа пируватоксидазы, зависимой, в частности, от тиаминпирофосфата. Однако кокарбоксилаза на скорость образования ацетата почти не влияет (увеличивает ее всего на 22%), из чего Levine с сотр. сделали вывод о способности Y. pestis синтезировать тиамин.

---

[1] Процесс фиксации CO_2 гетеротрофными организмами, к числу которых относится и Y. pestis, нельзя смешивать с ассимиляцией CO_2, присущей автотрофным организмам.

Образовавшаяся лимонная кислота в цикле Кребса подвергается превращению в цис-аконитовую кислоту и далее, через изолимонную, в α-кетоглютарат, для чего необходимы соответствующие ферменты — аконитатгидратаза и изоцитратдегидрогеназа (НАДФ). Их наличие у Y. pestis установлено Santer и Ajl (1954). Они же показали обратимость действия указанных ферментов в присутствии углекислоты. В результате Santer и Ajl выявили еще один механизм фиксации CO_2 (типа C_5+CO_2).

Последующее окисление α-кетоглютарата в конечном итоге приводит к регенерации щавелевоуксусной кислоты и замыканию цикла.

Е. П. Голубинский с сотр. (1971 г.) показали способность вакцинных и вирулентных штаммов Y. pestis окислять большинство промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот, а именно щавелевоуксусную, уксусную, лимонную, изолимонную, α-кетоглютаровую, янтарную, яблочную и фумаровую кислоты. Из числа ферментов, катализирующих эти превращения, у Y. pestis в непосредственных опытах обнаружены сукцинатдегидрогеназа (Dodin, Brygoo, 1960), малатдегидрогеназа (Е. П. Голубинский, В. И. Борзенкова, 1970), изоцитратдегидрогеназа (Е. П. Голубинский и др., 1971а) и фумараза (Н. В. Коробейник, 1968).

Кроме того, Е. П. Голубинский с сотр. (1971 г.) обнаружили выход радиоактивной CO_2 из 2-C^{14}-глюкозы. Учитывая, что глюкоза у Y. pestis распадается главным образом гликолитическим путем, это явление можно объяснить только наличием цикла Кребса. Важно, что в условиях гликолиза радиоактивность обнаруживается в ацетате, сукцинате и пирувате. С другой стороны, остается непонятным факт накопления в подобных экспериментах большого количества молочной кислоты. Нельзя не учитывать и того обстоятельства, что при окислении в культурах Y. pestis 1 моля глюкозы поглощается 1,3 моля кислорода. Возможно, скорость терминального окисления у Y. pestis слишком отстает от интенсивности гликолиза. В известной мере в пользу такого предположения могут свидетельствовать существенные различия в скорости потребления кислорода при окислении глюкозы и промежуточных продуктов цикла Кребса. Следует, однако, помнить, что, по мнению некоторых исследователей, ди- и трикарбоновые

кислоты плохо проникают в клетку. Несколько раньше Santer и Ajl (1954) установили внедрение радиоактивного углерода 2-C^{14}-ацетата в цитрат, сукцинат и α-кетоглютарат и выделили из клеток некоторые метаболиты цикла.

В заключение надо отметить, что интенсивность реакций цикла трикарбоновых кислот у Y. pestis несколько ниже, чем у Escherichia coli или Corynebacterium creatinoverans. Этим и объясняется высокий внутриклеточный фонд метаболитов цикла и соответственно весьма значительный уровень эндогенного дыхания у Y. pestis. Правда, последнее не препятствует окислению экзогенных субстратов.

Об обмене других соединений у Y. pestis, в частности липидов, нам известно очень мало. Можно лишь указать, что способность к гидролизу липидов (В. И. Рыкова, И. В. Домарадский, 1963; И. В. Домарадский и др., 1963) у нее отсутствует. Рано специально говорить и о регуляции метаболизма у Y. pestis, поэтому некоторые ее аспекты мы разбирали по ходу изложения основных данных по физиологии микроба.

Глава II

МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

В изменчивости организмов важное место занимает мутагенез. Термин «мутация» впервые был введен в 1890 г. де Фризом для обозначения внезапных изменений генотипа у высших растений. И хотя явление изменчивости у бактерий было обнаружено давно, прошло немало времени, прежде чем теория мутации нашла свое применение по отношению к бактериям. Как и у высших организмов, мутации у бактерий — это наследуемые изменения генетической информации, не связанные с рекомбинацией генов и проявляющиеся в виде изменений тех или иных признаков.

Мутации делят на спонтанные (естественные) и индуцированные. Однако при этом понятие спонтанности не равнозначно беспричинности. К спонтанным относят те виды мутаций, которые возникают у организмов без преднамеренного воздействия со стороны экспериментатора. Частота спонтанных мутаций обычно очень низка и выражается величинами порядка 10^{-4}—10^{-10} на одну бактерию в единицу времени или на одну генерацию (Н. Н. Жуков-Вережников, А. П. Пехов, 1963). В последние годы такие мутации чаще называют естественными, так как установление многочисленных мутагенных факторов проливает свет на причину спонтанного появления мутаций и позволяет объяснить их воздействием на организм различных факторов внешней среды и продуктов метаболизма клеток.

Для мутаций характерна наследуемость измененных признаков, относительно постоянная скорость мутирования каждого из них и, наконец, разнонаправленность.

Трудность обнаружения редко возникающих естественных мутантов вполне очевидна. Если же принять во внимание возможность недостаточно благоприятных условий для развития мутантов в популяции, в которой они возникают, то вероятность выживания и обнаружения мутантной клетки еще более уменьшается.

Частоту спонтанных мутаций можно существенно повысить путем воздействия на микроорганизмы различными мутагенами. Возникающие при этом мутации называют индуцированными. Мутагенами могут быть рентгеновы и ультрафиолетовые лучи, аналоги природных азотистых оснований, целый ряд химических веществ — от простых неорганических до сложных органических соединений, антибиотики и даже такие жизненно необходимые вещества, как аминокислоты (Э. Фриз, 1964; А. Г. Скавронская, 1967, и др.).

На чумном микробе в качестве мутагенов испытывалось сравнительно небольшое число физических и химических агентов. Различные исследователи изучали их влияние на ферментативную активность, потребность в питательных веществах, чувствительность к антибиотикам и вирулентность. Однако последний признак, по мнению всех экспериментаторов, является полигенным и настолько вариабельным, что трактовка результатов опытов крайне затруднительна. Поэтому на первом этапе исследований наиболее доступно изучение мутагенного действия различных факторов на менее сложные признаки, такие, как антибиотикорезистентность и зависимость от питательных веществ. Наибольшее число работ посвящено селекции ауксотрофных мутантов возбудителя чумы. Этот вид мутантов оказался весьма полезным как для выяснения путей синтеза микроорганизмами некоторых органических веществ, так и для изучения рекомбинаций и мутаций у бактерий.

МУТАГЕННОЕ И ЛЕТАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

В подавляющем большинстве исследований о мутагенном действии различных факторов на чумной микроб судили по изменению ограниченного числа признаков — ауксотрофности и антибиотикоустойчивости. В некоторых случаях у выделенных мутантов изучали и другие, неселективные, признаки (вирулентность, иммуногенность, ферментативную активность в отношении углеводов и спиртов и некоторые другие свойства). Применение рентгеновых лучей было направлено на получение мутантов возбудителя чумы, утративших или сни-

зивших вирулентность (Л. Н. Классовский, 1959; Burrows, Bacon, 1958, и др.). Однако необходимость соответствующей аппаратуры, специально оборудованных помещений и длительного воздействия рентгеновых лучей затрудняют их широкое применение для индукции мутаций у чумного микроба.

Из химических мутагенов малоактивными оказались уротропин, уретан, формальдегид (В. М. Степанов, 1968) и 8-азагуанин (Ю. Г. Сучков, Е. П. Голубинский, 1967, 1969). С помощью этих веществ удавалось индуцировать лишь единичные ауксотрофные мутанты. Аналогичной эффективностью обладали и УФ-лучи. После их воздействия на клетки Y. pestis стрептомицинустойчивые мутанты не появлялись, а ауксотрофные обнаруживались лишь с низкой частотой ($n \cdot 10^{-8}$) (В. М. Степанов, 1968; И. Л. Мартиневский, 1969; Ю. Г. Сучков, Е. П. Голубинский, 1969). Существенно повысить частоту мутаций по признакам метиониннезависимости, фенилаланиннезависимости и устойчивости к мономицину и стрептомицину удалось Ю. Г. Сучкову с сотр. (1970) в результате воздействия УФ-лучей на синхронизированные культуры вакцинного штамма EV. И. Л. Мартиневский (1972) с помощью ультрафиолетовой радиации получил lon-подобные мутанты из вирулентного штамма возбудителя чумы.

Гидроксиламин и 5-бромурацил в опытах по получению метиониннезависимых или стрептомицинустойчивых мутантов вообще оказались неактивными (Ю. Г. Сучков, Е. П. Голубинский, 1969).

Мутагенное действие антибиотиков в настоящее время не вызывает сомнения. Известны данные о том, что в процессе приобретения мутационной лекарственной устойчивости в присутствии антибиотиков бактерии могут изменять свои питательные потребности как в сторону повышения, так и в сторону снижения вплоть до прототрофности (В. Д. Тимаков и др., 1962; В. Г. Петровская, 1967, и др.).

Мутагенное действие антибиотиков на чумной микроб выявили Ю. Г. Сучков с сотр. (1971в). Авторы многократно пересевали антибиотикорезистентные естественно полиауксотрофные бактерии пяти штаммов Y. pestis на средах с мономицином, канамицином и стрептомицином, затем определяли число реверсий к независимости по одной из аминокислот. Установлено суще-

ственное (в 5—10 раз) повышение частоты появления ревертантов у культур, пассированных на средах с антибиотиками, по сравнению с культурами, которые пересевали на среде без лекарственных веществ. Мономицин и канамицин обладали большим мутагенным эффектом, чем стрептомицин. Несмотря на это, изученные антибиотики, видимо, тоже не могут быть причислены к активным мутагенам по отношению к возбудителю чумы.

Наиболее результативными оказались опыты по изучению мутагенного эффекта азотистой кислоты и особенно нитрозометилмочевины. На этих мутагенах целесообразно остановиться более подробно.

Азотистая кислота. Механизм ее мутагенного действия изучен сравнительно хорошо. Он сводится к дезаминированию оснований — гуанина, цитозина и аденина — с частотой, убывающей в порядке их перечисления (Э. Фриз, 1964). Возникающие при этом мутации представляют собой простые замены, исходящие преимущественно от пары гуанин—цитозин.

На модели чумного микроба было изучено как мутагенное, так и летальное действие азотистой кислоты. По данным Ю. Г. Сучкова и Е. П. Голубинского (1969), гибель чумных бактерий под действием азотистой кислоты наступала экспоненциально, но ей предшествовал непродолжительный (1—2 минуты) период замедленного отмирания клеток, что характерно и для кишечной палочки. С целью определения мутагенного эффекта эти же авторы исследовали бактерии штамма EV, обработанные азотистой кислотой. В 9 опытах удалось изолировать 21 стойкий ауксотрофный мутант (частота обнаружения $\sim 10^{-7}$). Из них 1 зависел от аргинина, 4 — от валина и изолейцина, 1 — от глицина, 3 — от гистидина, 1 — от метионина, 2 — от пролина, 1 — от треонина, 1 — от триптофана и 2 — от цистина; у 5 мутантов питательные потребности не были установлены. В опыте с вирулентным штаммом № 1217 при исследовании $1 \cdot 10^6$ клеток было изолировано 3 ауксотрофных мутанта: с зависимостью от аспарагиновой или глютаминовой кислоты, от лейцина и треонина. Специфичности в отношении индукции мутаций азотистой кислотой в определенных локусах не установлено: идентифицированные мутанты (19) имели зависимость от 11 различных аминокислот.

Нитрозометилмочевина. Мощное мутагенное действие N-нитрозо-N-метилмочевины (НММ) впервые было обнаружено на дрозофиле И. А. Рапопортом (1966). Из-за своей способности вызывать в сотни и тысячи раз больше мутаций по сравнению с радиацией и многими химическими веществами НММ отнесена к классу «супермутагенов».

Работами на актиномицетах было показано, что мутагенный эффект этого соединения сильно зависит от pH среды. Максимальное летальное и мутагенное действие НММ в опытах на актиномицетах и высших растениях проявляется в кислых растворах, снижается в нейтральных и почти отсутствует в щелочных. Такая зависимость позволила предположить, что влияние НММ на клетку сопровождается реакциями алкилирования и дезаминирования оснований ДНК.

На чумном микробе И. В. Ряпис с сотр. (1971а) получили данные о влиянии условий обработки бактерий НММ и физиологического состояния клетки на кинетику инактивации микробной популяции. Авторы изучили два варианта чумного вакцинного штамма EV (дикий ауксотрофный штамм и его прототрофный мутант) и один высоковирулентный штамм (№ 773). Кривая инактивации бактерий в первые 4 часа выражается экспонентой. Установлено, что в течение 6 часов существует прямая пропорциональная зависимость между концентрацией мутагена и числом инактивированных клеток. При этом оба варианта вакцинного штамма обладали одинаковой чувствительностью к мутагену и не отличались от вирулентного.

На проявление инактивирующего эффекта НММ существенное влияние оказала температура. Так, через 6 часов контакта с мутагеном при 4° выжило 44,5±5% бактерий, при 28° — 10±4,3%, при 37° — 4,7±1,5%, а при 40° — всего 1,5±0,22%.

Инактивирующее действие мутагена зависело и от pH среды. В резко кислой (pH 4,0) и щелочной (pH 8,0) средах наблюдался слабый эффект (6,8 и 11,4% соответственно) и отмирание бактерий происходило главным образом из-за изменения концентрации водородных ионов. Начиная с pH 5,0, инактивирующее действие НММ возрастало (36,1%) и достигало максимума при pH 6,0 и 7,0 (76 и 79%).

Установлено также, что чувствительность чумных бактерий к НММ изменялась в различных фазах раз-

вития клетки. При переходе из покоящегося состояния в лог-фазу чувствительность микробов к мутагену возросла почти в 2 раза; наибольшему влиянию НММ подвергались клетки в экспоненциальной фазе.

Таким образом, инактивирующий эффект НММ зависел от концентрации мутагена, продолжительности его воздействия на бактерии, температуры и pH среды, а также от фазы развития клеток. Полученные данные использованы для индукции мутаций у чумного микроба (Ю. Г. Сучков и др., 1971б). Для получения ауксотрофных мутантов с помощью НММ были выполнены опыты на диком ауксотрофном и мутантном прототрофном вариантах штамма EV. В каждом из них после обработки мутагеном анализировали от $0{,}8 \cdot 10^6$ до $3{,}7 \cdot 10^6$ жизнеспособных бактерий. У обоих вариантов образовывались ауксотрофные мутанты под действием НММ примерно с одинаковой частотой — $3{,}3 \cdot 10^{-5}$ для исходного и $7{,}7 \cdot 10^{-5}$ для прототрофного варианта.

При изменении условий обработки бактерий НММ (0,1% мутагена вместо 0,01%, экспозиция 2 часа вместо 18 часов) инактивирующий эффект возрос почти в 1000 раз, а частота обнаружения ауксотрофных мутантов увеличилась более чем в 600 раз и составила величину $6{,}9 \cdot 10^{-3}$ (И. В. Ряпис, 1971). Большинство выделенных мутантов оказались стойкими ауксотрофами, и лишь 6% клонов реверсировали к исходному фенотипу.

Питательные потребности образовавшихся ауксотрофных мутантов были довольно разнообразны, хотя можно отметить, что из штамма № 1300 селекционировали преимущественно аргинин- и пуринзависимые мутанты. Около 50% ауксотрофов, полученных из прототрофного варианта штамма EV, приходилось на мутанты с блоком синтеза серусодержащих аминокислот, а из дикого варианта чаще других изолировали аргининовые мутанты. По-видимому, соответствующие локусы изученных штаммов оказались более чувствительными к мутагенному действию НММ по сравнению с другими.

Кроме одинарных ауксотрофных мутантов, были выявлены двойные: 18 зависимых от тирозина и триптофана и 16 — от изолейцина и валина. У всех изученных двойных мутантов наблюдали реверсии к исходному фенотипу с частотами 10^{-6}—10^{-8} и никогда не

Таблица 11

Частота встречаемости антибиотикоустойчивых мутантов чумного микроба (штамм № 773)

Концентрация антибиотика в селективной среде (в мкг/мл)		Частота мутантов $\cdot 10^{-8} \pm m_{0,95}$			
		контроль	УФ	HNO_2	НММ
Пенициллин	6	42±5,8	38±5,5	33±5,1	~1000
	15	0[1]	0	0	215±13
Стрептомицин	25	2,2±1,3	3,5±1,7	20±4	~1000
	50	0	0	0	200±13
Мономицин	50	310±16	292±15	268±15	~1000
	100	9±3	0	5±2	270±15

[1] 0 — мутанты не обнаружены.

наблюдали утраты зависимости только от одной из аминокислот. Аналогичным образом вели себя изолейцинвалинзависимые мутанты, индуцированные азотистой кислотой. Следовательно, более обоснованным является предположение об одноступенчатом мутировании изолированных двойных биохимических мутантов чумного микроба.

Поскольку описанные исследования мутагенной активности различных химических и физических агентов проводились разновременно, сравнительная оценка изученных мутагенов в значительной мере затруднена. Определенный интерес с этой точки зрения представляет серия одновременных опытов, выполненных Ю. Г. Сучковым с сотр. (1971 г.) с различными мутагенами (УФ-лучи, азотистая кислота и нитрозометилмочевина). Работа выполнена на двух штаммах чумного микроба — вакцинном и вирулентном № 773. Кроме того, использовано 8 ауксотрофных мутантов Y. pestis EV, индуцированных НММ. Существенно изменить частоту обратных мутаций удалось в основном после обработки бактерий НММ. На двух ауксотрофных мутантах штамма EV обнаружен также мутагенный эффект азотистой кислоты. Однако частота встречаемости ревертантов после воздействия НММ была в 25—350 раз больше, чем после применения HNO_2.

Еще более наглядные результаты получены в опытах с индукцией антибиотикоустойчивых мутантов

штамма № 773 (табл. 11). После обработки бактерий азотистой кислотой достоверно возросло число вариантов, резистентных к стрептомицину, но не изменилась встречаемость пенициллинустойчивых и мономицинустойчивых мутантов. НММ оказывала наиболее выраженный эффект как по количеству индуцированных вариантов, так и по степени их резистентности по отношению ко всем трем антибиотикам.

Следовательно, среди испытанных мутагенов наиболее эффективной оказалась НММ. Более слабым эффектом обладала азотистая кислота. С помощью УФ-радиации при летальной дозе от 50 до 99,9% в этих опытах не удалось изменить частоту естественного мутирования у изученных штаммов чумного микроба по признакам устойчивости к антибиотикам и обратных мутаций от ауксотрофности к дикому фенотипу.

ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУТАНТОВ ЧУМНОГО МИКРОБА

Мутационное изменение какого-либо признака может сопровождаться вариациями других свойств как за счет плейотропного действия мутации, так и за счет коррелятивной связи между некоторыми функциями клетки. Известно, что повышению питательных потребностей у микроорганизмов различных видов, в том числе и у чумных бактерий, нередко сопутствует понижение вирулентности и количественное или качественное изменение антигенного состава бактерий (В. Г. Петровская, 1967). Однако не выяснено, существует ли при этом функциональная зависимость между характером питания и продукцией отдельных антигенов или такая связь случайна и является следствием двух или более независимых мутационных событий в разных локусах. Всестороннее исследование возникающих мутантов с этой точки зрения крайне необходимо и представляет значительный интерес.

Сравнительное изучение ауксотрофных вариантов Y. pestis по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам (Б. Н. Мишанькин, Ю. Г. Сучков, 1970) показало, что в основном они не отличаются от клеток дикого типа: не ферментируют глицерин, рамнозу, сахарозу, лактозу, мочевину, неподвижны, расщепляют глюкозу и арабинозу, обладают денитри-

фицирующей и нитрифицирующей активностью (за исключением двух мутантов, утративших способность к нитрификации), лизируются чумным и псевдотуберкулезным поливалентными бактериофагами. Это совпадает с данными В. М. Степанова (1968) о том, что появление ауксотрофности у штаммов возбудителя чумы обычно не отражается на их культурально-биохимических свойствах. Впрочем, один цистеинзависимый мутант, полученный после воздействия НММ (И. В. Ряпис и др., 1971б), не образовывал типичных колоний на некоторых сериях агара Хоттингера и замедленно (на 5—6-й день) ферментировал маннозу, ксилозу, арабинозу и галактозу.

Таким образом, дополнительная потребность в питательных веществах обычно не сопровождается изменением морфологических, культурально-биохимических свойств и чувствительности к бактериофагам.

Б. Н. Мишанькин и Ю. Г. Сучков (1970) занимались также изучением активности альдолазы — одного из ферментов гликолитического пути усвоения углеводов — у ауксотрофных мутантов, полученных из двух вариантов Y. pestis EV и вирулентного штамма № 1217. Активность альдолазы была достоверно снижена по сравнению с диким типом у 28 мутантов из 31 исследованного. Наряду с этим авторы на семи штаммах показали, что спонтанная изменчивость чумного микроба к прототрофности не сопровождается снижением активности альдолазы.

Ю. Г. Сучков с сотр. (1971а) изучили содержание некоторых специфических для чумного микроба антигенов (фракции I и II) у 23 выделенных ауксотрофных мутантов. Кроме того, ими был определен антигенный состав отдельных мутантов методом двойной диффузионной преципитации в геле.

Количественная оценка фракций I и II у исследованных ауксотрофов и их родительских штаммов в реакции нейтрализации антител показала, что содержание фракции I у мутантов достоверно снижено, в то время как существенного изменения содержания токсина (фракция II) не обнаружено.

Число линий преципитации у тех же ауксотрофов колебалось от 10 до 20, тогда как у исходного штамма EV наблюдалось 20 линий. У мутантов, нуждающихся в изолейцине и валине, гистидине, цистине, пролине, ко-

личество линий преципитации доходило до 11. У метионин-, треонин- и глицинзависимых, а также у трех неидентифицированных по питательным потребностям мутантов было отмечено 10 полос преципитации, а у одного мутанта с неустановленными питательными потребностями —12. Отдельные мутанты с зависимостью от перечисленных выше аминокислот образовывали до 15—20 линий преципитации.

Казалось бы, на основании этих данных можно сделать заключение, что некоторые мутации по питательным потребностям сопровождаются изменением антигенного состава чумного микроба. Однако, если популяция исходного штамма до воздействия испытанными мутагенами была неоднородна по антигенному составу, такой вывод, по мнению авторов, оказался бы ошибочным. Ю. Г. Сучков с сотр. (1971а) провели сравнительное изучение антигенного состава 20 случайно отобранных клонов вакцинного штамма EV (производство Ставропольского противочумного института, серия № 24Ш, контроль № 115). Оказалось, что они отличаются друг от друга по количеству образуемых линий преципитации (от 10 до 18). Поэтому авторы считают, что изменение числа полос преципитации у ауксотрофных мутантов чумного микроба могло быть обусловлено неоднородностью бактериальной популяции по антигенному составу.

Особый интерес, на наш взгляд, представляют пока еще немногочисленные наблюдения о связи питательных потребностей с вирулентностью и иммуногенностью микробов. В 1950 г. Bacon с сотр. (цит. по В. Г. Петровской, 1967) опубликовали результаты изучения вирулентности для белых мышей 93 биохимических мутантов S. typhimurium, которые включали в себя 25 групп, отличающихся по потребности в питательных веществах. Большинство мутантов сохранили вирулентность. Три мутанта с зависимостью от аспарагиновой кислоты, один — от парааминобензойной кислоты, а также пять из шести пуринзависимых вариантов оказались авирулентными.

Работа Bacon с сотр. привлекла внимание других исследователей, и за ней последовала серия статей о связи ауксотрофности с вирулентностью. Однако с чумным микробом было выполнено сравнительно немного исследований. Подробный анализ работ о потребности

7 Заказ № 6541

этого возбудителя в факторах роста приведен в I главе книги. Здесь лишь укажем, что в итоге среди множества изученных диких вирулентных штаммов возбудителя чумы обнаружены зависимые от нескольких аминокислот в разных сочетаниях, включая фенилаланин, метионин, цистеин, треонин, тирозин, серин, валин, изолейцин, лейцин, аргинин, пролин и триптофан. Следовательно, по крайней мере в отношении таких штаммов можно считать доказанным отсутствие непосредственной связи их вирулентности с аминокислотной потребностью. В опытах В. М. Степанова (1968) вопреки первоначально сложившимся представлениям (И. Л. Мартиневский, 1969) дополнительная зависимость бактерий от многих испытанных аминокислот также не имела прямой связи с вирулентностью. Вместе с тем Burrows и Bacon (1958) было определенно установлено, что большинство пуринзависимых мутантов возбудителя чумы утрачивают вирулентность. Авторы объяснили это отсутствием свободных пуринов в организме животных, а следовательно, невозможностью бактерий размножаться в месте их инокуляции. Позднее Brubaker (1970) выяснил, что вирулентность пуриндефицитных мутантов зависит от локализации метаболического блока. Вирулентность не менялась при локализации блока до образования de novo инозинмонофосфата (ИМФ), но резко падала (в 10^6—10^7 раз) при блоке между ИМФ и гуанинмонофосфатом.

Иммуногенность некоторых индуцированных ауксотрофных мутантов вакцинного штамма Y. pestis EV была проверена на белых мышах (Ю. Г. Сучков и др., 1971а). Два изолейцинвалинзависимых мутанта, один лейцинзависимый и один тирозинзависимый сохранили иммуногенность дикого штамма. Иммуногенность гистидинзависимого и двух пуринзависимых мутантов была резко снижена за счет плохой приживаемости бактерий в организме животного.

Значительно меньше сведений имеется о свойствах ферментативных мутантов чумного микроба. Селекционированные из популяции диких штаммов спонтанные ферментативные мутанты по остальным изученным признакам (культурально-морфологическим, отношению к чумному и псевдотуберкулезному бактериофагам, вирулентности) не отличались от родительского штамма (Н. Т. Николаенко, 1969).

Следовательно, фактические материалы указывают на то, что в одних случаях с возникновением мутации изменяется только единственный признак возбудителя чумы, а в других — многие его свойства. Такие различия могут быть связаны прежде всего с размерами мутировавшего участка. В настоящее время принято выделять точечные мутации и крупные перестройки, так называемые хромосомные аберрации. Последние могут захватывать один или много генов, в то время как точечные мутации являются следствием выпадения, замены и вставки единственного или нескольких оснований обычно в пределах одного гена, при этом повреждается незначительная его часть.

Здесь будет уместным привести данные одной из последних работ И. Л. Мартиневского (1972). Ему впервые удалось выделить lon-подобные мутанты Y. pestis, которые обратили на себя внимание тем, что формировали морфологически измененные колонии. Мутанты оказались авирулентными для лабораторных животных. Заключая результаты этого исследования, автор высказывает мысль, что любая мутация репарационной системы может быть полезной для решения вопросов, связанных с вирулентностью чумного микроба.

По-видимому, степень изменчивости возбудителя чумы, как и других микроорганизмов, может зависеть от размеров измененного участка в молекуле ДНК, плейотропного действия мутации, а также от наличия или отсутствия коррелятивной связи между отдельными признаками.

КАРТИРОВАНИЕ ХРОМОСОМЫ ЧУМНОГО МИКРОБА МЕТОДОМ ИНДУЦИРОВАННЫХ МУТАЦИЙ

Управление мутационным процессом является одним из вероятных прикладных направлений в генетике. Не случайно вопросу специфичности мутагенеза посвящено большое число исследований, обобщенных в хорошо известных обзорах Ш. Ауэрбах (1966), Р. И. Салганика (1969) и др. При этом под термином «специфичность мутагенеза» подразумевается возможность получения преимущественно тех или иных мутаций под влиянием определенных мутагенных воздействий.

В процессе изучения механизма мутаций под влиянием многих агентов установлено избирательное взаи-

модействие некоторых из них с определенными основаниями ДНК. Так, было выявлено, что многочисленные алкилирующие соединения реагируют преимущественно с гуанином; азотистая кислота дезаминирует аденин и цитозин, а гидроксиламин избирательно изменяет цитозин (Э. Фриз, 1964). Однако, по мнению ряда авторов, в том числе одного из ведущих специалистов в области мутагенеза — Ш. Ауэрбах (1966), возможность использования избирательного взаимодействия некоторых веществ с определенными элементами ДНК для индукции мутантов с заданными свойствами весьма проблематична. По данным Р. И. Салганика (1969), значительно большие перспективы для направленного мутагенеза открываются в связи с установлением локального повышения чувствительности ДНК к мутагенам. В частности, было выявлено, что в местах репликации ДНК, где происходит нарушение ее вторичной структуры, наблюдается повышенная чувствительность реплицирующихся участков к мутагенам. Введение формальдегида или гидроксиламина в среду с синхронно растущими клетками кишечной палочки в различные моменты лаг-фазы приводило к преимущественной индукции определенных мутаций, т. е. фактически к направленному мутагенезу. Altenbern (1966) обнаружил связь между временем репликации хромосомы и выходом определенных мутантов после воздействия нитрозогуанидином. Полный цикл репликации хромосомы Staphylococcus aureus продолжался 60 минут, и за это время автор определил локализацию 8 генов. Позже (1969) он же установил локализацию еще 7 генов у 6 штаммов S. aureus (у всех штаммов последовательность генов была одинаковой). Генетическая репликационная карта одного штамма кишечной палочки, полученная воздействием нитрозогуанидина, полностью совпала с картой E. coli K-12, составленной методом прерванной конъюгации (Cerdá-Olmedo, Hanawalt, 1968). Следовательно, новый метод картирования дает возможность изучать локализацию генов на хромосоме тех бактерий, у которых не обнаружен процесс конъюгации.

Поскольку для возбудителя чумы лишь недавно выявлена конъюгационная система, позволяющая надеяться на ее перспективность для целей картирования хромосомы (О. А. Проценко, 1972), Ю. Г. Сучковым с сотр. (1970), Ю. Г. Сучковым и Б. Н. Мишанькиным (1972)

была предпринята попытка локализовать некоторые гены с использованием метода индуцированных мутаций.

С этой целью синхронизированные голоданием и холодовым шоком клетки вакцинного штамма EV phe^- met^- str^s mon^s инкубировали в синтетической среде № 199 и в разные сроки лаг-фазы подвергали воздействию 170±25 эрг/мм² УФ-лучей или 0,01% НММ с экспозицией 30 минут. Сразу после облучения бактерии высевали на две синтетические среды: с фенилаланином, но без метионина (для выявления met^+-мутаций) и с метионином, но без фенилаланина (для выявления phe^+-мутаций). Поскольку после мутагенного воздействия для формирования антибиотикоустойчивых форм требуется несколько циклов деления бактерий, подвергнутые УФ-облучению и отмытые от НММ клетки помещали в бульон Хоттингера, инкубировали при 28° в течение 48 часов, а затем высевали на среды со стрептомицином (50 мкг/мл) и мономицином (50 мкг/мл).

В опытах 1 и 2 лаг-фаза длилась около 10 и 8 часов соответственно. Пробы для облучения брали с интервалом 2 часа. Сокращение лаг-фазы в опыте 2 произошло за счет уменьшения экспозиции клеток в охлажденном (+4°) фосфатном буфере с 18 часов (опыт 1) до 3 часов. В опыте 3 в качестве мутагена применили НММ, а бактерии перед контактом с ней выращивали при аэрации в аппарате с горизонтальным вращением (90 об/мин), что позволило сократить лаг-фазу до 6 часов.

В табл. 12 представлены результаты определения частоты встречаемости мутантов после обработки клеток мутагенами. В опыте 1 максимальные частоты выявлены для mon^r через 0 часов, для met^+ и phe^+ через 6 часов и str^r через 8 часов инкубации клеток в синтетической среде до мутагенного воздействия. Однако для phe^+ и mon^r мутантов нарастание их числа не является статистически достоверным, поэтому по результатам этого опыта можно допустить лишь такую схему репликации хромосомы: met ... str. По приведенным результатам нельзя было установить последовательность mon и phe локусов. В повторном опыте с использованием УФ-лучей достоверное повышение частоты встречаемости phe^+ мутантов наблюдали у бактерий в возрасте 4 часов, met^+ мутантов — 6 часов, а str^r — в возрасте 8 часов. Следовательно, в данном случае выявле-

Таблица 12

Частота встречаемости мутантов после воздействия на бактерии УФ-лучами (опыты 1, 2) и НММ (опыт 3)

Опыт	Возраст культуры (в часах)	Частота встречаемости мутантов на 10^6 живых бактерий $\pm m_{0,95}$			
		met+	phe+	str^r	mon^r
1	0	1,40±0,34	2,53±0,56	0,75±0,41	8,4±2,9
	2	—	—	2,40±0,77	5,4±1,3
	4	0,71±0,14	2,20±0,32	0,5 ±0,32	4,4±1,1
	6	2,52±0,37	3,15±0,45	1,0 ±0,46	6,0±1,4
	8	0,24±0,04	0,72±0,09	50,0±2,5	4,3±1,1
	10	—	—	0,25±0,23	5,3±1,3
2	0	0,11±0,05	6,0±1,92	0,5 ±0,32	—
	4	0,56±0,37	18,1±7,24	1,3 ±0,45	—
	6	0,96±0,27	3,2±0,7	0,9 ±0,45	—
	8	0,07±0,04	1,68±0,34	5,5 ±1,32	—
	10	0,09±0,04	1,42±0,20	0,25±0,23	—
3	0,5	0	—	0	29,1±1,5
	1	0	1,26±0,18	0	3,2±1,0
	2	0	1,90±0,46	0	1,2±0,5
	3	0	2,20±0,58	0	5,5±1,3
	4	0,25±0,07	1,37±0,27	0	1,2±0,5
	5	0,10±0,05	1,23±0,22	0	2,9±0,9
	6	0	0,85±0,17	0	2,0±0,7

П р и м е ч а н и е. Значок — означает, что исследование не производилось, 0 — мутанты не обнаружены.

на последовательность met ... phe. Как и в опыте 1, максимальный выход str^r мутантов наблюдался позднее. В опыте 3 в качестве мутагена применяли нитрозометилмочевину. Достоверный максимум mon^r мутантов установлен через 30 минут, phe+ — через 2—3 часа, а met+ — через 4 часа. В этих условиях постановки эксперимента не удалось выявить str^r мутантов. Таким образом, положение всех локусов, кроме mon, было установлено как минимум в двух независимых экспериментах с применением разных мутагенов.

Подводя итог всем трем опытам, авторы допускают следующую последовательность расположения локусов на хромосоме чумного вакцинного штамма EV: mon ...

phe ... met ... str. Расстояние между локусами phe и met, по-видимому, меньше, чем между локусами mon и phe, а также met и str. В пользу близкого расположения локусов phe и met свидетельствуют результаты опытов 1 и 2, в которых наблюдалось совместное повышение частоты встречаемости phe^+ и met^+ мутантов.

Поскольку у авторов нет уверенности в том, что в их опытах всегда имели место истинные обратные, а не супрессорные мутации, установленная локализация четырех генов на хромосоме чумного микроба является ориентировочной и нуждается в последующем уточнении, особенно в расположении локусов phe^+ и met^+.

Заканчивая главу, попытаемся суммировать наиболее важные, на наш взгляд, положения.

Среди испытанных на чумном микробе мутагенов наибольшей эффективностью при индукции антибиотикоустойчивых и ауксотрофных мутантов обладает нитрозометилмочевина. При одинаковых условиях обработки этим препаратом двух вариантов вакцинного штамма EV и вирулентного штамма чумного микроба наблюдались близкие значения частот мутирования. Обнаружена определенная специфичность в выходе ауксотрофных мутантов, которая определялась генотипом родительского штамма. Воздействие ультрафиолетовой радиации или нитрозометилмочевины на синхронно развивающуюся популяцию чумного микроба в отдельные моменты лаг-фазы выявило преобладание мутантов определенного вида. Тем самым показана принципиальная возможность картирования хромосомы чумного микроба методом индуцированного мутагенеза на синхронно растущих клетках этого микроорганизма.

Глава III

РЕКОМБИНАТИВНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Наряду с мутационной изменчивостью микроорганизмов существует и так называемая комбинативная изменчивость, обусловленная перераспределением генетической информации родителей в потомстве. У бактерий этот тип изменчивости выявлен сравнительно недавно и назван рекомбинацией. Передача наследственной информации от донора реципиенту в данном случае осуществляется за счет трех специфических механизмов: трансформации, трансдукции и конъюгации.

ТРАНСФОРМАЦИЯ

Явление трансформации описано раньше других известных в настоящее время феноменов генетической рекомбинации. Термином трансформация обозначен процесс, при котором часть свободной ДНК клетки-донора проникает в клетку-реципиент и вступает в рекомбинацию с ДНК его хромосомы, что приводит к образованию потомства с некоторыми свойствами донора. Первоначально это явление было изучено на пневмококках, а позднее его обнаружили у самых различных видов микроорганизмов.

Воспроизведение феномена трансформации у чумного микроба может представить большой интерес для изучения изменчивости его свойств и построения генетической карты. Однако попытки осуществить трансформацию у возбудителя чумы были малоуспешными. Burrows (цит. по И. В. Домарадскому, 1971) не удалось получить трансформанты, так же как Л. Н. Классовскому и Л. И. Терентьевой (1963).

Н. М. Соколова и Г. П. Никитина (1965) пассировали чувствительные к стрептомицину бактерии чумы на средах с фильтратами культур устойчивого к этому антибиотику штамма. Ими были селекционированы стрептомицинустойчивые варианты, которые авторы предпо-

ложительно отнесли к трансформантам. Но в связи с тем что опыты проводили не с очищенной ДНК, трансформационное происхождение описанных вариантов является спорным. С равной долей вероятности их возникновение можно объяснить и мутациями под действием продуктов метаболизма, которые могли быть в фильтратах.

Г. М. Орлова с сотр. (1971) предприняли попытку трансформировать у чумного микроба прототрофность, способность к синтезу специфического капсульного антигена (фракция I по Бекеру) и стрептомицинустойчивость. Реципиентами были стрептомицинчувствительные варианты чумного микроба (штаммы EV № 1230, 1230-А, 1253), зависимые от двух аминокислот (метионина и фенилаланина), и варианты, не способные к синтезу капсульного антигена (штаммы $EVF1^-$, № 1230-А и 1253). Их выращивали в присутствии ДНК донорского штамма EV, обладающего фракцией I, прототрофностью и стрептомицинустойчивостью. Как и отдельные реципиентные штаммы (EV и $EVF1^-$), донор был негативным по отношению к глицерину. Препараты ДНК имели следующие показатели: N/P—1,8, вязкость — 66, молекулярный вес — $7{,}4 \cdot 10^6$, $E_{260}/E_{230}=2{,}1$. Авторами было выполнено 58 опытов, каждый из которых включал от 4 до 10 вариантов, представляющих собой комбинацию различных условий (возраст культуры, продолжительность экспозиции с ДНК, состав среды, количество исследуемого материала и некоторые другие).

В большей части экспериментов антибиотикоустойчивые бактерии вообще не были обнаружены, в ряде случаев устойчивые формы встречались в опытных и контрольных пробах примерно с одинаковой частотой. При этом отношения частот их встречаемости колебались от 0,6 до 2 и не были статистически значимыми. Только в 4 случаях резистентные варианты обнаруживались в опытных пробах в количестве, существенно превышающем их число в контрольных посевах (табл. 13).

По мнению авторов, наибольший интерес представляют результаты последних трех приведенных в таблице экспериментов, выполненных с одним и тем же препаратом ДНК. Различия в числе резистентных колоний в контроле и опыте были в данном случае статистически достоверными.

Таблица 13

Результаты некоторых опытов по передаче стрептомициноустойчивости от штамма EV

Реципиентные штаммы	Концентрация стрептомицина в селективной среде (в мкг/мл)	Частота встречаемости устойчивых бактерий среди 10^9 клеток		Отношение частот встречаемости
		опыт	контроль	
EV str^s	100	0,73	<0,15	>4,9
№ 1230-А	10	37 333	1325	28,2
№ 1230-А	10	75 000	247	33,6
№ 1230-А	10	615	86	7,2

При последующем исследовании полученного потомства оказалось, что все бактерии стрептомицинустойчивы в значительно большей степени, чем аналогичные варианты, выделенные из контрольных проб. Каких-либо изменений питательных потребностей не обнаружено. Большинство предполагаемых трансформантов из опыта с реципиентным штаммом № 1230-А, кроме стрептомицинустойчивости, приобрели способность образовывать фракцию 1, но сохранили прежнюю глицеринпозитивность, отличающую их от донора. Анализ полученных результатов, по мнению авторов, дает основание предполагать, что им удалось трансформировать стрептомицинустойчивость и способность к синтезу специфического чумного антигена (фракция 1). Но в связи с тем что условия, необходимые для воспроизведения результатов, пока не установлены, чумной микроб лишь с большой оговоркой можно отнести к микроорганизмам, у которых трансформация обнаружена.

Не исключено, что в представленных экспериментах воздействие ДНК осуществлялось в условиях, далеких от оптимальных для проявления компетентности у чумного микроба. С другой стороны, существует определенная трудность в создании стандартных условий опыта, что в большой степени мешает воспроизведению результатов. Дальнейшие исследования по трансформации должны быть направлены на стандартизацию препаратов ДНК, подбор синтетических и полусинтетических стандартных сред и изыскание дополнительных факторов, увеличивающих компетентность клеток.

ТРАНСДУКЦИЯ

Передача генетической информации от одной бактериальной клетки к другой с помощью бактериофагов, чаще всего умеренных, получила название трансдукции.

Как правило, объем информации невелик и ограничивается одним или двумя генами, тесно сцепленными на хромосоме. Впервые этот тип рекомбинации был открыт у сальмонелл. Позднее были обнаружены два типа трансдукции, проявление которых в значительной степени зависело от особенностей трансдуцирующих фагов: общая (или неспецифическая), в процессе которой может быть передан любой признак, и специфическая, характеризующаяся переносом строго определенных генетических детерминантов, расположенных на хромосоме, по соседству с местом прикрепления того или иного профага.

До недавнего времени в литературе отсутствовали сведения о трансдукции у чумного микроба, вероятно, потому, что исследователям не удавалось выделить умеренные бактериофаги у этого возбудителя. Настойчивые поиски привели к изоляции штаммов бактериофагов, отнесенных авторами к чумным умеренным.

Один из них, бактериофаг Н, был выделен Н. Н. Новосельцевым в 1967 г. из органов морской свинки, зараженной бактериями штамма № 1565 Y. pestis. Подробный анализ работ Н. Н. Новосельцева по выделению Н-фага нами уже проводился (И. В. Домарадский, 1971). К умеренным фаг был причислен в силу того, что он формировал на индикаторном штамме чумного микроба в основном мутные негативные колонии и не вызывал видимого лизиса клеток в бульонных культурах. Более того, часть бактерий чувствительных штаммов после обработки Н-фагом приобрели устойчивость к нему и способность продуцировать аналогичный фаг даже после 10-кратного пересева на плотной среде со специфической антифаговой сывороткой, что послужило автору основанием для утверждения о лизогенизации этих бактерий Н-фагом.

К характеристике Н-фага следует добавить, что он обладает определенной антигенной специфичностью и нечувствителен к нейтрализующему действию антифаговых сывороток, специфичных для поливалентных чумного и дизентерийного фагов, колипротейного, колидизентерийных (T_3 и T_7), псевдотуберкулезных (I и II серотип) и λ-фагов. Н-фаг лизирует большинство штам-

мов возбудителя чумы, единичные штаммы Shigella и Escherichia и не лизирует бактерии возбудителя псевдотуберкулеза.

К сожалению, Н. Н. Новосельцеву не удалось повторно выделить этот же фаг при равных условиях опыта, поэтому весьма сомнительны высказывания о лизогенности предполагаемого штамма-продуцента (№ 1565) и его непосредственной причастности к выделению Н-фага, тем более что ни в прошлых, ни в последних работах не приведена характеристика штамма № 1565 по признаку лизабельности Н-фагом как на популяционном, так и на клоновом уровне. Более того, все штаммы возбудителя чумы, использованные в последующих экспериментах, проявляли чувствительность к Н-фагам, т. е. были индикаторами их, в том числе и штамм EV — источник одного из Н-фагов. Но если лизогения у чумного микроба все же существует, как считает Н. Н. Новосельцев, возникает вопрос, почему профаги Н не обеспечивают иммунитета к суперинфекции гомологичным фагам даже при малой множественности заражения, оптимальной для размножения Н-фагов.

Недавно были опубликованы работы (Н. Н. Новосельцев, 1970а; Н. Н. Новосельцев и Б. Н. Мишанькин, 1970), согласно которым авторам удалось лизогенизировать Н-фагом 19 штаммов возбудителя чумы и отдельные штаммы Shigella и E. coli. Этот факт сам по себе очень интересен и достоин внимания, так же как и описанное здесь же снижение альдолазной активности, наблюдаемое у большинства изученных штаммов после приобретения ими устойчивости к фагу. Однако в отношении оценки признаков лизогенности авторам можно возразить. Здесь и в других работах Н. Н. Новосельцева лизогенными считаются культуры, сохранившие устойчивость к Н-фагу и способность продуцировать его после 5—10 пассажей на плотных питательных средах, «смоченных специфической антифаговой сывороткой». Но такая же ситуация может наблюдаться при псевдолизогении. Б. Н. Мишанькин, Ю. Г. Сучков (1973) показали с помощью электронного микроскопа наличие свободных и адсорбированных частиц вирулентного фага в культурах псевдолизогенных штаммов возбудителя чумы, пассированных от 2 до 10 раз на плотной среде с соответствующей антифаговой сывороткой. Видимо, на плотной среде не создается оптимальных условий

для полной инактивации свободного фага. Вполне вероятно, что в жидких средах нейтрализующее действие сыворотки значительно полнее, но, к сожалению, таких наблюдений авторы параллельно не проводили.

С другой стороны, вирулентность штамма № 1300 чумного микроба и его клона, приобретшего устойчивость к Н-фагу, была в равной степени высокой. LD_{50} для морских свинок и белых мышей не превышала 10 микробных клеток (Н. Н. Новосельцев, И. В. Рыжко, 1970). Сохранение вирулентности резистентных к Н-фагу бактерий говорит больше в пользу их лизогенного состояния, поскольку Girard (1957), Б. Н. Мишанькин и Ю. Г. Сучков (1973) показали у псевдолизогенных клонов возбудителя чумы снижение вирулентности вплоть до ее утраты. Однако, проводя такое сравнение, не следует забывать, что речь идет о двух резко различных фагах: поливалентном чумном и Н. Не исключено, что каждый из них независимо от того, обусловливает ли он лизогенизацию или псевдолизогенизацию клеток хозяина, может по-разному влиять на вирулентность бактерий — непосредственно или косвенно.

По мнению Н. Н. Новосельцева и И. В. Рыжко (1970), лизогенизированные Н-фагом бактерии сохраняют способность продуцировать фаг как in vivo, так и после выделения из организма инфицированных морских свинок.

Возможность сохранения фага, внесенного вместе с культурой, авторы отвергают на том основании, что у контрольных морских свинок, которым вводили только Н-фаг, на 3—8-е сутки его не обнаруживали. К сожалению, присутствие фага, судя по данным работы, выявляли лишь прямым методом, хотя применение метода обогащения могло бы дать результаты, представляющие не меньший интерес, тем более что сами авторы, проводя сравнение с другими фагами, ссылаются на работу Е. Н. Алешиной и А. Д. Бибиковой (1949), которые обнаружили вирулентный чумной фаг прямым методом через 9 суток после его введения морским свинкам, а методом обогащения — через 25 суток. Следует также учитывать, что длительность сохранения фага в организме в присутствии клеток возбудителя чумы может быть значительно большей, чем это удается проследить при инъекции животным только фага. Кроме того, если даже исключить возможность длительного

существования в организме морских свинок Н-фага, занесенного с культурой, факт сохранения фагопродукции культурами после одного пассажа через животных можно толковать по-разному. Б. Н. Мишанькин и Ю. Г. Сучков (1973) заражали животных псевдолизогенными культурами возбудителя чумы. После одного пассажа бактерии либо утрачивали способность продуцировать фаг, вызывая гибель животных и выделяясь в виде субкультур чувствительных бактерий, либо не давали летального исхода, исчезая при этом из организма. С другой стороны, по данным Girard (1957), продукция фага сохранялась после одного и даже двух пассажей псевдолизогенных бактерий через организм экспериментальных животных.

Видимо, при оценке лизогенного состояния необходимо учитывать все возможные отклонения от общепринятых тестов.

В. С. Ларина (1969а, 1970) описала два бактериофага: Л-413 «tu» и Л-413 «С», выделенных ею непосредственно из клеток Y. pestis штамма № 413 в процессе их многократного пассирования на агаре Хоттингера. Бактериофаг типа «tu» формировал мутные пятна на газоне индикаторного штамма, не давал видимого лизиса бактерий в бульоне или вызывал крайне слабое просветление бульонных культур. Часть бактерий после обработки фагом Л-413 приобретали устойчивость к нему и способность продуцировать аналогичный фаг. Эти свойства сохранялись после 10 пассажей культур в бульоне, содержащем антифаговую сыворотку. На основании таких данных сделано заключение об умеренности фага. Несколько позже аналогичный фаг был выделен из другого штамма (№ 358) чумного микроба (П. И. Анисимов, В. С. Ларина, 1971). Анализ популяции штаммов № 413 и 358 показал неоднородность их клеточного состава и некоторые различия между ними. Большинство клеток штамма № 413 были чувствительны к выделенным фагам. Лишь малая часть их обладала резистентностью и способностью к спонтанной фагопродукции. Напротив, штамм № 358 состоял в основном из бактерий, продуцирующих фаг и устойчивых к нему. Неоднородность популяций по изученным признакам не противоречит предположению авторов о лизогенном состоянии штаммов № 413 и 358, так как подобные наблюдения были сделаны А. Г. Сомовой (1971) в

отношении заведомо лизогенных штаммов холерного вибриона.

УФ-лучи в 10 раз увеличивали продукцию фага Л-413, свидетельствуя, таким образом, об индуцибельности этого процесса. Максимальный титр полученных бактериофагов не превышал 10^7 корпускул/мл. Дикие клоны штаммов № 413 и 358 продуцировали в основном фаг Л-413 «С», образующий условно прозрачные негативные пятна. Длительное пассирование культур в бульоне со специфической антифаговой сывороткой приводило к полному исчезновению фаговых частиц типа «С» и появлению или относительному увеличению числа корпускул типа «tu». Далее титр фага «tu» тоже значительно уменьшался до единичных корпускул в 1 мл культуральной жидкости, а в некоторых случаях активный фаг переставал выявляться вовсе, хотя устойчивость к нему бактерии по-прежнему сохраняли. Исчезновение фагопродукции наблюдалось также у культур, многократно и часто пересеваемых или длительно хранившихся на агаре Хоттингера. Сейчас трудно объяснить это явление. Авторы считают работу еще не законченной. Можно надеяться, что определение адсорбционной способности непродуцирующих, но устойчивых к фагу клеток с помощью электронного микроскопа и других принятых методик, а также изучение возможности индукции у них фага Л-413 УФ-лучами, митомицином и т. п. внесет ясность в эти исследования.

Выделенные В. С. Лариной (В. С. Ларина и др., 1970) фаги относятся к не известному ранее серологическому типу и обладают высокой специфичностью, в силу чего они способны лизировать только штаммы возбудителя чумы и именно те из них, которые находятся в R-форме. В популяциях OR- и RO-штаммов к фагам чувствительны бактерии, дающие в дальнейшем R-клоны.

Обобщая все изложенное о фагах, выделенных Н. Н. Новосельцевым и В. С. Лариной, можно сказать, что многие высказывания и предположения авторов нуждаются еще в дополнительной экспериментальной проверке, поэтому решать вопрос о лизогении у чумного микроба, видимо, сейчас еще преждевременно. Противоречия, отмеченные в описании Н-фагов, встречаются и в работах В. С. Лариной. Их устранение будет в значительной мере способствовать решению проблемы ли-

зогении у возбудителя чумы. Можно высказать сожаление, что почти за 5 лет, прошедших с момента выделения Н-фагов и Л-413, не представилось случая сравнить их, хотя такое исследование во многом прояснило бы целый ряд вопросов.

Заканчивая раздел, следует отметить работу Ю. И. Кондрашина и П. И. Анисимова (1970), утверждающих возможность лизогенизации возбудителя чумы Т-фагами кишечных бактерий. Однако этот факт еще нуждается в проверке и дополнительных доказательствах.

Выделенные фаги В. С. Ларина (1969б) и Н. Н. Новосельцев (1970б) использовали в опытах трансдукции. Оба автора пытались трансдуцировать признак устойчивости к стрептомицину. Донорами в их опытах служили вирулентные ферментирующие глицерин (ГЦ+) стрептомицинустойчивые (str^r) штаммы, а реципиентом — вакцинный глицеринпегативный, чувствительный к стрептомицину штамм EV. Обоим экспериментаторам удалось передать признак str^r. Полученные рекомбинанты, по мнению авторов, были лизогенными; в опытах В. С. Лариной они ничем, кроме устойчивости к стрептомицину, не отличались от родительского штамма, а в экспериментах Н. Н. Новосельцева отмечена совместная передача признаков str^r и ГЦ+. Эти признаки стойко сохранялись и у бактерий, утративших способность к продукции Н-фага и устойчивость к нему. По результатам совместной передачи двух признаков (str^r и ГЦ+) Н. Н. Новосельцев пришел к выводу о близкой локализации соответствующих детерминантов в хромосоме Y. pestis.

Таким образом, в опытах с обоими фагами авторам удалось наблюдать появление стрептомицинустойчивости у бактерий, выросших в присутствии фаголизатов стрептомицинустойчивых культур, содержащих активные фаги. Можно ли здесь предполагать трансдукцию? Видимо, да. Однако в опытах В. С. Лариной и Н. Н. Новосельцева не было контроля, исключающего возможность трансформации. Вполне вероятно, что фаголизаты культур могут содержать в себе свободные фрагменты ДНК хромосомы клеток-доноров. Выше (стр. 104) уже говорилось, что такие компоненты могут обладать трансформирующей активностью. Поэтому крайне необходима была контрольная проба, содержа-

щая, кроме фаголизата и реципиентных бактерий, еще ДНК-азу.

Судя по данным литературы (В. С. Ларина, 1969б, Н. Н. Новосельцев, 1970б), стрептомицинустойчивые варианты возбудителя чумы удалось получить лишь в одной серии опытов. Продолжение таких экспериментов целесообразно для выяснения вопроса о правомерности отнесения фагов, выделенных Н. Н. Новосельцевым и В. С. Лариной, к трансдуцирующим. Это в свою очередь сыграет, вероятно, определенную роль в решении проблемы существования лизогении у чумного микроба. Ведь известно, что все обнаруженные случаи трансдукции чаще связаны с теми или иными умеренными фагами, хотя, с другой стороны, нельзя полностью отвергать и возможность трансдукции с помощью вирулентных специфических и особенно гетерогенных фагов.

КОНЪЮГАЦИЯ

Половой фактор и попытки передачи хромосомных маркеров у возбудителя чумы. Под конъюгацией понимают прямой контакт клеток донора и реципиента, при котором может происходить передача наследственной информации. Этот способ обмена генетическим материалом между различными бактериями является аналогом полового процесса высших многоклеточных организмов.

Способность клеток выступать в роли донора генетической информации связывают с наличием в них определенных внехромосомных элементов, называемых эписомами, плазмидами или факторами переноса. Один из них, F-фактор, типичный представитель бактериальных эписом, может находиться как в автономном состоянии, так и в интегрированном с хромосомой. В последнем случае F-фактор способен переносить хромосому от донора («мужские» клетки) реципиенту («женские» клетки), обеспечивая возможность формирования рекомбинантов.

Автономно расположенная F-эписома может переходить в реципиентную клетку с высокой частотой (70—100% из расчета на клетку донора). С приобретением F-эписомы реципиент сам становится донором ее, но другие свойства клетки не изменяются, так как хромосомные гены в этом случае не передаются.

В популяциях доноров число клеток с интегрированным в хромосому F-фактором может колебаться от долей процента (F^{+}-штам-

8 Заказ № 6541

мы) до 90—100%. Штаммы с высоким содержанием таких клеток, способные осуществлять передачу хромосомных генов с частотой 10^{-1}—10^{-3}, названы Hfr. Штаммы Hfr отличаются от F+ высокой частотой переноса хромосомных маркеров и чрезвычайно низкой частотой передачи самого полового фактора, который в Hfr-состоянии внедрен в бактериальную хромосому и проникает в реципиентную клетку последним, так как локализуется дистальнее остальных бактериальных генов.

Помимо описанных доноров, F+ и Hfr, известны другие, несущие так называемые замещенные факторы, или F′-факторы. Характерной особенностью этих типов эписом является наличие в них отдельных оперонов хромосомы бактерий, например детерминантов ферментации лактозы (F-lac+), галактозы (F-gal+) или синтеза пролина (F-pro+), или больших фрагментов хромосомы (F_{13}, F_{14}). Частота скрещивания бактерий кишечной палочки, опосредованного этим типом половой эписомы, близка к той, которую можно наблюдать при передаче автономного F-фактора от донора F+. F′-факторы способны самореплицироваться в клетках хозяина и, перенося в реципиентную клетку хромосомные детерминанты, ассоциированные с ними, всегда осуществляют собственный перенос, сообщая бактериям F− способность быть донором. При интегрировании F′-факторов в хромосомы бактериальные клетки приобретают свойства Hfr-штамма. Для тех хромосомных генов донорских клеток, которые привнесены F′-факторами в реципиентные клетки, рекомбинация между ДНК данных эписом и хромосом реципиентов не нужна. Именно поэтому, по-видимому, хромосомные гены, включенные в состав F′-факторов, значительно чаще удается передать микроорганизмам иного вида или даже рода по сравнению с Hfr-штаммами. Однако степень гомологии ДНК F′-факторов и хромосом все же имеет определенное значение (Д. Г. Кудлай, 1969).

Следует подчеркнуть, что основные сведения о половой рекомбинации получены в экспериментах на кишечной палочке. На других микроорганизмах вопрос изучен значительно слабее, а исследования на модели чумного микроба находятся на самом начальном этапе.

Изучение половой рекомбинации у возбудителя чумы ведется в двух основных направлениях: выявление диких штаммов, обладающих способностью вступать в рекомбинацию, т. е., возможно, имеющих половой фактор, и передача чумному микробу факторов F или F′ кишечной палочки с выяснением возможности последующей рекомбинации.

К исследованиям первого направления следует отнести прежде всего работу Burrows, опубликованную в 1962 г. (цит. по И. В. Домарадскому, 1971). В его опытах все попытки скрещивания ауксотрофов Y. pestis, а также Y. pestis с Y. pseudotuberculosis оказались безрезультатными. Поскольку медленный рост чумного микроба и сложный состав применяемой питательной

среды затрудняли проведение исследований, последующие эксперименты Burrows проводил на 48 штаммах возбудителя псевдотуберкулеза. Ауксотрофные мутанты каждой из пяти серологических групп Y. pseudotuberculosis ни в одном случае не дали рекомбинации.

Мы тоже пытались найти природные донорские штаммы чумного микроба (И. В. Домарадский, 1971). Методом совместного культивирования была изучена 371 пара, составленная произвольно из 72 ауксотрофных штаммов чумного микроба. Для селекции возможных рекомбинантов мы избрали признак прототрофности. В 32 случаях в опытных пробах на селективной глюкозо-минеральной среде были получены колонии потомства, возникавшие с частотой 10^{-5}—10^{-8}. Почти полное отсутствие воспроизводимости результатов не позволило нам провести полноценный анализ данных. Лишь в кроссе с участием одного штамма (№ 1856) удалось дважды получить сходные положительные результаты при последующих отрицательных данных в восьми повторностях.

Селекционированное потомство из всех опытов с положительным результатом можно было разделить на две основные группы. Субкультуры первой группы — это истинные прототрофы, стабильные при многократных пересевах методом изолированных колоний и хранении при +4° в течение 2—6 месяцев (срок наблюдения). Вторая группа — субкультуры, не способные расти при пересевах на глюкозо-минеральной среде в виде изолированных колоний и дающие слабый рост при пересеве петлей. Специально выполненные эксперименты позволили объяснить возникновение субкультур второй группы синтрофизмом (С. А. Лебедева и др., 1970). В отношении происхождения прототрофов первой группы пока трудно дать определенный ответ. Вряд ли их появление можно объяснить половой рекомбинацией. Скорее всего прототрофное потомство могло возникнуть за счет трансдукции или мутаций. Частота мутаций по сравнению с контролем могла возрасти за счет некоторых продуктов метаболизма в смешанных культурах. Так или иначе, но, судя по результатам этих исследований, мы склонны признать отсутствие половой дифференциации Y. pestis.

П. И. Анисимов и О. А. Проценко (1970) пытались выявить «мужские» варианты чумного микроба среди

большого числа музейных штаммов, используя специфические бактериофаги (f_2, MS2), лизирующие клетки E. coli, несущие F-фактор и бактериофаг φ II, лизирующий клетки F^-. Все изученные штаммы были чувствительны только к «женскому» фагу φ II. Поэтому авторы пришли к выводу об отсутствии в природе чумных штаммов F^+. Аналогичное исследование было проведено также С. А. Лебедевой (неопубликованные данные): штаммы возбудителя чумы оказались чувствительными к фагу φ II и устойчивыми к f_2.

Однако такой подход к решению проблемы половой дифференциации у возбудителя чумы не совсем оправдан. Molnar и Lawton (1971) обнаружили, что известные ДНК-содержащие и РНК-содержащие «мужские» специфические (MS2, f_1, f_2, Q и др.) фаги не способны образовывать видимых пятен фаголизиса на газоне культуры чумных бактерий, ставших донорами после приобретения F-lac- и F-Cm-факторов от кишечной палочки. Это обусловлено способностью большинства клеток в популяции изученных штаммов ограничивать внутриклеточное развитие фаговых корпускул. С другой стороны, если предполагать у возбудителя чумы наличие видоспецифических половых эписом, вероятно, нелогично рассчитывать на их выявление с помощью фагов, избирательно действующих на клетки, обладающие F-факторами кишечной палочки.

Второе направление в изучении половой рекомбинации у чумного микроба, как уже говорилось, связано с использованием известных F- или F′-факторов кишечной палочки.

До начала 60-х годов все попытки скрестить E. coli F^+ с чумным микробом были безрезультатными. Но в 1962 г. Martin и Jacob передали F-lac-эписому от кишечной палочки возбудителю чумы. Ими был изучен характер фенотипической экспрессии этой плазмиды в клетках нового хозяина. О. А. Проценко и П. И. Анисимов (1968) пошли по тому же пути, передав возбудителю чумы фактор F-lac$^+$. Они дополнили характеристику его фенотипического выражения в клетках чумного микроба электронномикроскопическим исследованием специфических половых ворсинок, показав сходство их структуры с соответствующими ворсинками E. coli (П. И. Анисимов и др., 1970). О. А. Проценко и П. И. Анисимов (1969) на модели возбудителя чумы

показали, что процесс синтеза β-галактозидазы, детерминируемый F-lac-эписомой, индуцибелен и не отличается от наблюдаемого у E. coli.

Lawton с сотр. (1968) продолжили исследования, начатые Burrows (И. В. Домарадский, 1971) на модели Y. pseudotuberculosis. Авторы оправдывают такой подход к проблеме большей доступностью возбудителя псевдотуберкулеза для изучения и близким родством его с чумным микробом. В этих экспериментах впервые была доказана возможность передачи хромосомных генов при скрещивании двух штаммов возбудителя псевдотуберкулеза, один из которых предварительно получил F-lac-эписому от E. coli. Анализируя частоту встречаемости маркеров у рекомбинантов возбудителя псевдотуберкулеза, Morris и Burrows (1968) выявили следующий порядок расположения генов на хромосоме донорского штамма MRE2027:

O ... arg-8 ... p4s-2 ... trp-3 ... spD-1 ... met-5 ... str-11 ..., his-8

где p4s — локус, ответственный за чувствительность к фагу IV Y. pseudotuberculosis, a spD — локус, определяющий образование специфического полисахарида группы D.

Позднее Lawton и Stull (1971) методом прерываемого скрещивания установили время переноса 7 локусов и показали, что хромосома Y. pseudotuberculosis MRE 2027 передается по крайней мере в виде двух групп сцепления:

1 — ... arg his ... trp
(14′) (14′) (77′)
2 — ... pro ... thr ... lys ... tyr
(11′) (25′) (50′) (67′)

К сожалению, авторы не располагали штаммами, у которых мутации затрагивали бы признаки, локализованные как в той, так и в другой группе сцепления. Поэтому пока не ясно, расположены ли упомянутые выше группировки детерминантов обособленно друг от друга или существуют в виде одной последовательности, перемежающей отдельные изученные гены.

Оба варианта вполне вероятны. Что касается первого из них, то у E. coli, например, известно несколько участков на хромосоме, обладающих аффинитетом к фактору фертильности, и поэтому на-

бор переносимых при конъюгации детерминантов зависит именно от того, в каком участке хромосомы был интегрирован F-фактор (Д. Г. Кудлай, 1969).

Как бы то ни было, полученные исследователями данные можно расценивать как первые элементы генетической карты Y. pseudotuberculosis, ближайшего родственника Y. pestis.

Эти исследования получили продолжение в работе McMahon (1971). Правда, автор использовал другие штаммы Y. pseudotuberculosis. Ему удалось селекционировать донор с интегрированной в хромосому F-lac-эписомой, обеспечивающей высокую частоту рекомбинации, и благодаря этому предположительно определить порядок расположения нескольких маркеров на хромосоме Y. pseudotuberculosis MRE 4018:

... pur-15 ... ilv-3 ... met-2 ... ilv-4 ... arg-40 ... leu-7 ... pyr-1 ... tyr-8 ... pur-19 ... leu-5 ... pur-25 ... leu-6 ... pro-11 ... his-28 ... tyr-7 ... his-21 ... his-25 ... his-26 ... his-22 ... his-27 ... ser-5 ...

Пока еще трудно говорить о сходстве или отличии в расположении изученных генов у возбудителя псевдотуберкулеза и кишечной палочки или сальмонелл. Исследования продолжаются, и не исключено, что уже в скором будущем появится возможность высказать определенное суждение по этому вопросу.

Получение стабильных донорских штаммов Y. pseudotuberculosis позволило Lawton с сотр. (1968) приступить к изучению рекомбинаций у чумного микроба. Им удалось установить возможность передачи возбудителю чумы маркеров agr$^+$, mel$^+$, ∅IV^s, rha$^+$, ure$^+$ с низкой частотой (10^{-7} на клетку донора). Однако несколько позже Molnar и Lawton (1971) сообщили о том, что хотя кроссы между Y. pseudotuberculosis и Y. pestis оказались фертильными, фактор F-lac$^+$ передавался в скрещиваниях без хромосомных маркеров.

О. А. Проценко (1972) использовала в качестве донора штамм Y. pestis F-lac$^+$ и получила при скрещивании варианты ауксотрофных реципиентных штаммов чумного микроба, которые приобрели признаки, свойственные донору: arg$^+$, lys$^+$, gly$^+$, leu$^+$ или pro$^+$. Так как исследования велись на разных штаммах, взаимосвязь указанных маркеров установить не удалось. Автор считает возможным отнести полученные варианты к рекомбинантам, возникновение которых обусловлено

фертильностью донора (F-lac$^+$). Однако окончательный ответ на вопрос о происхождении измененных вариантов чумного микроба, по мнению О. А. Проценко, может быть получен лишь в ходе дальнейших исследований.

Lawton и Stull (1972) селекционировали штамм Y. pestis, наделенный F-Cm-эписомой E. coli, который оказался способным переносить свою хромосому ауксотрофным реципиентам чумного микроба с частотой переноса генов, приблизительно равной 10^{-6}. Полученные в экспериментах данные позволили авторам прийти к выводу о близкой локализации pig$^+$ и his$^+$ маркеров и тесном сцеплении генов his и arg. Наблюдалась передача thr$^+$-маркера, но, судя по результатам исследований, он, видимо, локализован вне участка хромосомы, объединяющего гены pig, his и arg.

Значительные успехи, полученные в картировании хромосомы Y. pseudotuberculosis, и положительные результаты первых экспериментов по созданию системы скрещивания у возбудителя чумы позволяют надеяться, что в ближайшем будущем исследователям удастся построить если не полную генетическую карту хромосомы Y. pestis, то хотя бы ее фрагменты, которые позже можно будет связать в единое целое.

Фактор множественной лекарственной устойчивости. Вторым внехромосомным элементом, способным обеспечить конъюгацию, является фактор множественной лекарственной устойчивости, или R-фактор.

Явление множественной лекарственной устойчивости обнаружено впервые Kitamoto с сотр. (см. Д. Г. Кудлай, 1969). В состав R-фактора входит трансмиссивная частица RTF и комплекс генов, определяющих резистентность к антибиотикам. Предполагают, что R-фактор может формироваться в процессе сцепления RTF-частицы, или фактора Δ по Anderson с детерминантами антибиотикоустойчивости хромосомного или внехромосомного происхождения. В настоящее время известны R-факторы, обеспечивающие бактериям устойчивость к 4—8 и более лекарственным веществам, в число которых входят стрептомицин и другие аминогликозиды, пенициллины, тетрациклины, цефалоспорины, макролиды, хлорамфеникол и его производные, сульфаниламиды и фуразолидоны.

Явление множественной лекарственной устойчивости распространено среди микроорганизмов, включая кишечные бактерии, протей, стрептококки, стафилококки и другие виды. Следует отметить, что внехромосомные элементы, ответственные за антибиотикоустойчивость разных микроорганизмов, видимо, значительно различаются. Это проявляется, например, в неспособности R-плазмид стафилококков и стрептококков обеспечивать собственный перенос

от донора к реципиенту. В то же самое время R-факторы кишечных бактерий сравнительно легко передаются при внутривидовом скрещивании. Частота их трансмиссии обычно колеблется в пределах 10^{-2}—10^{-4} на клетку донора, хотя иногда бывает и ниже.

Особый интерес представляют многочисленные наблюдения о возможности межвидовой и межродовой передачи R-фактора. Однако, по единодушному мнению исследователей, эффективность конъюгации в этом случае ниже, чем при внутривидовом скрещивании.

В доступной литературе нам не удалось обнаружить работ, указывающих на наличие R-факторов у распространенных в природе штаммов возбудителя чумы.

Возможность трансмиссии эписомы множественной лекарственной устойчивости от E. coli бактериям Y. pestis и Y. pseudotuberculosis в эксперименте была установлена впервые Ginoza и Matney в 1963 г., а позднее подтверждена и другими авторами (см. И. В. Домарадский, 1971).

Частота передачи различных R-факторов в опытах ряда исследователей колебалась в значительных пределах. П. И. Анисимов и А. А. Синичкина (1968) наблюдали перенос R-фактора от E. coli CSH-2-R 222 штамму чумного микроба с частотой 10^{-4}—10^{-6}. По их мнению, способность эксконъюгантов образовывать колонии в значительной мере зависит от селекционирующих факторов. В ряде опытов скрещивания, когда для элиминации бактерий донора по методике Watanabe и Fukasawa (см. Д. Г. Кудлай, 1969) использовали кишечный бактериофаг, на селективной среде с антибиотиками наблюдали неспецифический лизис реципиентных бактерий Y. pestis. Авторы считают, что это могло обусловить снижение частоты формирования рекомбинантных колоний, в связи с чем они отдают предпочтение методике, по которой рост донорских клеток кишечной палочки подавляют генцианвиолетом, добавленным к питательному агару одновременно с антибиотиками. Однако в опытах С. А. Лебедевой (неопубликованные данные) этот метод не оправдал себя. Использованные ею донорские штаммы кишечной палочки (4018/62, 9667/64 — штаммы Lebek; JE 51 и CSH-2-R 222 — штаммы Watanabe) при высеве на селективную среду с антибиотиком и генцианвиолетом (1 : 100 000) в дозе, предусмотренной методикой постановки опыта, росли в виде сплошного тонкого налета, что в значительной мере затрудняло подсчет и изоляцию колоний

чумных эксконъюгантов. Увеличение концентрации генцианвиолета приводило к частичной ингибиции роста бактерий чумы и снижению частоты выявления антибиотикоустойчивых эксконъюгантов. Поэтому С. А. Лебедева в своих исследованиях воспользовалась методикой, описанной в работе Кпарр и Lebek (1967), согласно которой рост донорских клеток E. coli подавляют полимиксином, учитывая определенную степень природной резистентности к нему чумного микроба. Скрещивая бактерии таким методом, удавалось выявить эксконъюганты чумного микроба в зависимости от штамма-донора с частотой 10^{-3}—10^{-7} на клетку реципиента (С. А. Лебедева, 1969; Кпарр, Lebek, 1967).

Интересно отметить, что в экспериментах Кпарр и Lebek антибиотикоустойчивые эксконъюганты были выявлены не у всех штаммов Y. pestis, использованных в качестве реципиентов. На основании этого можно было бы сделать вывод, что способность воспринимать R-фактор присуща не каждому штамму возбудителя чумы.

Однако С. А. Лебедева выявила значительные различия в чувствительности штаммов чумного микроба к полимиксину. Получить относительно однородные популяции (70—100% резистентных клеток) удавалось лишь после 2—3 пересевов на среде с этим антибиотиком. При таких условиях опыта автор смог доказать реципиентную способность всех 27 изученных штаммов, различных по вирулентности и выделенных в разных природных очагах чумы. Использование диких штаммов Y. pestis без предварительных пассажей на среде с полимиксином значительно ухудшало результаты скрещиваний и приводило к резкому снижению частоты выявления эксконъюгантов. Можно предполагать, что именно эта причина определила отрицательные результаты некоторых кроссов в опытах Кпарр и Lebek (1967).

Частота формирования рекомбинантов может зависеть не только от условий опыта, но и от видовой принадлежности реципиента; так, при сравнительном изучении акцепторной способности различных пастерелл (Кпарр, Lebek, 1967) оказалось, что у Y. enterocolitica R-эксконъюганты встречаются в 100 и более раз чаще, чем у других видов. Кроме того, эффективность скрещиваний в какой-то мере зависит и от штаммовых различий реципиентов и ряда других факторов.

Что касается характера переноса R-факторов, то сведения по этому вопросу весьма разноречивы. В опытах Knapp и Lebek штамм E. coli 9667/64 передавал реципиентам все три детерминанта антибиотикоустойчивости (к стрептомицину, тетрациклинам и хлорамфениколу), а в случае E. coli JE 51 в отдельных кроссах в процессе переноса происходила сегрегация детерминанта резистентности к тетрациклину. Те же доноры в экспериментах С. А. Лебедевой (1969) обладали иной характеристикой: штамм JE 51 передавал свой R-фактор целиком, а от штамма 9667/64 чумные бактерии приобретали только два маркера антибиотикоустойчивости (к стрептомицину и хлорамфениколу). Одинаковый характер переноса наблюдали у донора E. coli 4018/62: все шесть детерминантов лекарственной устойчивости передавались одновременно. А вот штамм CSH-2-R 222 вел себя по-разному. В одних опытах с его участием появлялись эксконъюганты Y. pestis, устойчивые к трем (стрептомицин, хлорамфеникол и тетрациклин), двум (стрептомицин, хлорамфеникол) и одному (тетрациклин) антибиотикам (П. И. Анисимов, А. А. Синичкина, 1969), в других опытах R-фактор этого штамма передавался полностью (С. А. Лебедева, 1969) и только при последующем культивировании эксконъюгантов появлялись сегреганты, аналогичные описанным выше.

Объяснить такие различия в поведении R-факторов довольно трудно. Специальные исследования в этом направлении не проводились. Возможно, играют роль отличия в деталях постановки опытов или некоторые изменения свойств субкультур донорских штаммов при хранении их в разных лабораториях. Но в подавляющем большинстве случаев набор детерминантов антибиотикоустойчивости, если он представлял одну группу сцепления, передавался полностью.

Касаясь длительности сохранения внехромосомной антибиотикоустойчивости у пастерелл и йерсиний, следует отметить наибольшую стабильность эксконъюгантов P. multocida. Через 6 месяцев после выделения почти все клетки в их популяции обладали R-фактором. У рекомбинантов других видов проявлялась выраженная тенденция к спонтанной утрате R-плазмиды. Наименее стабильными оказались эксконъюганты Y. pestis и Y. pseudotuberculosis. Более 95% клеток в их популяциях утратили R-факторы (доноры E. coli 4018/62 и

9667/64). Сегрегация отдельных детерминантов чаще всего приводила к потере устойчивости к тетрациклину (Knapp, Lebek, 1967). По данным П. И. Анисимова и А. А. Синичкиной (1970), R-фактор штамма E. coli CSH-2-R 222 с наибольшей частотой утрачивался свежевыделенными рекомбинантами чумного микроба, значительно реже — длительно хранившимся. Частота элиминации фактора множественной лекарственной устойчивости значительно возрастала при многократных пересевах на питательных средах. Содержание рекомбинантов в полужидком агаре без пересевов, а также лиофильное высушивание обеспечивали сохранение у чумных бактерий фактора резистентности в течение 3 лет (срок наблюдения). К сожалению, авторы не приводят цифровой материал, дающий возможность провести более глубокий анализ их данных.

Стабильность множественной лекарственной устойчивости у штаммов чумного микроба была предметом детального исследования и в наших опытах (не опубликовано). Изучались эксконъюганты с R-факторами fi+ (подавление активности F-эписомы) и fi⁻-типов. В случае fi+-R-факторов стойкими оказались субкультуры рекомбинантов, высушенные лиофильно. Полиантибиотикоустойчивость сохранялась у них в течение всего срока наблюдения ($1^1/_2$ года), причем процентное содержание резистентных клеток в популяциях практически не изменялось. При выдерживании эксконъюгантов в столбике агара Хоттингера в течение года без пересевов fi+-R-факторы проявляли нестабильность и обнаруживались в среднем у 50% культур. Значительно изменился и состав популяции в сторону преобладания чувствительных к антибиотикам бактерий.

Пересевы с интервалами 1 месяц, 2 недели и особенно 2 дня приводили к значительному ускорению сегрегации и элиминации R-факторов. У многих эксконъюгантов в процессе хранения их на питательных средах проявилась высокая степень нестабильности маркера устойчивости к тетрациклину, отмеченная и другими исследователями, в том числе П. И. Анисимовым и А. А. Синичкиной (1969), которые наблюдали ее не только in vitro, но и в опытах in vivo: из 12 субкультур, выделенных ими от павших животных, устойчивость к тетрациклину утратили 11. Напротив, R-фактор fi⁻-типа был стабильным в клетках чумного микроба

(С. А. Лебедева и др., 1972): эксконъюганты, получившие эту плазмиду от возбудителя дизентерии, сохраняли ее при всех условиях культивирования, описанных выше, причем в популяциях изученных рекомбинантов 100% клеток были резистентными к антибиотикам.

Как fi+-, так и fi⁻-R-факторы, находясь в клетках возбудителя чумы, сохраняли трансмиссивность и чувствительность к акрифлавину.

Пока трудно объяснить наблюдаемые различия в поведении двух типов R-фактора. Известно, что одной из причин, определяющей длительность существования в клетке чужеродной ДНК, является степень ее гомологии с хромосомой хозяина. Чем она меньше, тем интенсивнее модифицирующее и ограничивающее воздействие со стороны бактерии-носителя. Установлено, что в геномах некоторых fi⁻-R-факторов имеются hs II-детерминанты, ответственные за специфичность к хозяину (Bannister, 1970, и др.). Не исключено, что изученный С. А. Лебедевой с соавторами fi⁻-R-фактор тоже несет ген, аналогичный hs II, поэтому, попадая в клетки возбудителя чумы, он модифицируется, увеличивая тем самым сходство с ДНК хромосомы хозяина. Возможно, «аутомодификация» в присутствии «своего» гена-модификатора осуществляется таким образом, что функции fi⁻-R-фактора и его наследственный материал не подвергаются значительным изменениям. Напротив, у fi+-R-факторов пока не выявлено подобных механизмов и их модификация происходит за счет систем клетки-хозяина.

Если механизм действия hs II-гена R-факторов пока недостаточно изучен, то о модификациях чужеродной ДНК внутри бактериальной клетки есть достаточно много сведений. Значительную роль в этом процессе отводят метилированию ДНК специфическими ДНК-метилизами (Б. Ф. Ванюшин, 1968). Не исключено, что метилирование ДНК имеет определенное значение в регуляции начала и прекращения считывания информации, а его искажение вызывает нарушение этих процессов и ошибки в репликации ДНК. Учитывая высокую видовую специфичность ДНК-метилаз, можно ожидать, что в случае fi+-R-факторов метилирование их ДНК гетерологичными метилазами клетки-носителя вызовет ошибки считывания, которые, накапливаясь при многократной репликации, приведут к дефектности тех или иных генов. По-видимому, такие дефекты будут усиливаться с каждой репликацией по направлению считывания информации, поэтому гены должны «отключаться» в последовательности, обратной порядку их расположения по отношению к точке инициации считывания.

В пользу высказанного предположения свидетельствует факт, отмеченный многими исследователями на разных видах бактерий: в большинстве случаев для каждого R-фактора существует определенная очередность утраты тех или иных детерминантов антибиотикоустойчивости, соответствующая порядку их расположения в эписоме (см. генетическую карту R-факторов; Д. Г. Кудлай, 1969). Несомненно, эта гипотеза нуждается в экспериментальной проверке, так как исследований R-факторов в таком направлении, насколько нам известно, не проводилось.

Не исключено, что отдельные сегреганты могут возникать за счет мутаций R-фактора, возможно, по типу делений, как это предполагают Watanabe и Ogata (1970).

Watanabe и Lyang (1962), а также Hashimoto и Hirota (1966) предполагают, что сегрегация отдельных детерминантов R-факторов может происходить в процессе рекомбинаций между плазмидной и хромосомной ДНК. В результате этого те или другие маркеры присоединяются к хромосоме и утрачивают трансмиссивность. Nisioka с сотр. (1970) обнаружили среди сегрегантных R-факторов типы с укороченной нитью генома и такие, у которых длина контура ДНК была равна длине ДНК исходного R-фактора.

Уровень устойчивости к лекарственным веществам у бактерий, приобретших R-факторы, может варьировать в значительной степени и зависит не только от реципиента, но и от индивидуальных особенностей R-плазмиды.

Нами изучена степень резистентности рекомбинантов чумного микроба, получивших факторы множественной лекарственной устойчивости от восьми донорских штаммов бактерий из семейства Enterobacteriaceae. Штаммовые различия реципиентов обусловливали колебания уровня резистентности эксконъюгантов. У 27 изученных штаммов устойчивость популяций клеток к стрептомицину изменялась в пределах 500—3000 мкг/мл, к левомицетину — 100—300 мкг/мл, к тетрациклину колебалась от 200 до 700 мкг/мл, к канамицину — от 3000 до 6000 мкг/мл. Размах колебаний у разных клонов одного штамма был меньше. Степень устойчивости зависела и от R-фактора. Например, бактерии могли быть устойчивы к 50 мкг/мл тетрациклина в присутствии одного из R-факторов и к 500—700 мкг/мл этого антибиотика в присутствии другого. Разные R-факторы определяли резистентность к пенициллину на уровне 600—1200 мкг/мл и 4200—4800 мкг/мл.

Недавно (1971) была опубликована работа Э. Т. Таллмейстера с соавторами. Они изучили 11 R-факторов кишечной палочки и обнаружили, что каждый из них определяет разную степень устойчивости E. coli к стрептомицину (5—1000 мкг/мл), левомицетину (5—1000 мкг/мл) и пенициллину (25—10 000 мкг/мл). Различия уровней резистентности можно отнести за счет ряда причин. Но, прежде чем говорить о них, видимо, следует упомянуть о механизмах внехромосомной антибиотикоустойчивости.

Мнения большинства исследователей сходятся на том, что главную роль в устойчивости к некоторым антибиотикам играют определенные ферменты, инактивирующие их. Для пенициллинов и цефалоспоринов это β-лактамазы (пенициллиназы), для хлорамфеникола и его производных — специфические ацетилтрансферазы; инактивация стрептомицина и других аминогликозидов может происходить за счет фосфорилирования, аденилирования или ацетилирования. Тетрациклины, по-видимому, составляют исключение:

обнаружено, что устойчивость к ним связана со специфическим изменением проницаемости клеточной стенки (Ю. О. Сазыкин, 1972; Д. Г. Кудлай и др., 1972). Вполне вероятно, что последнее обусловлено нарушением в системе пермеаз (Г. Н. Ролинсон, 1971) или индуцибельным усилением транспорта тетрациклина из периплазматического пространства клетки во внешнюю среду (В. К. Плакунов, 1973).

Инактивирующие ферменты, синтез которых детерминирован различными R-факторами, могут отличаться друг от друга. В настоящее время доказано, что пенициллиназы различны как по субстратной специфичности, так и по активности, что в значительной мере определяет степень устойчивости бактерий, несущих тот или иной R-фактор. По аналогии такую же ситуацию можно предположить и в отношении других инактивирующих антибиотики ферментов.

Значительные колебания в степени устойчивости могут проявляться также в зависимости от видовой принадлежности бактерии-хозяина. Так, в 1969 г. Smith показал, что при передаче R-фактора от E. coli Pr. mirabilis эксконъюганты протея имели в 100 раз меньшую пенициллиназную активность по сравнению с донорами и другими реципиентами из семейства Enterobacteriaceae (см. Д. Г. Кудлай, 1969). И это несмотря на то, что в их клетках было обнаружено до 10 копий R-фактора, тогда как у кишечной палочки на каждую клетку приходилось не более одной копии. Smith считает, что такое явление вызвано нарушением контроля за фенотипической экспрессией R-фактора со стороны Pr. mirabilis. При этом, очевидно, затрагивается не только регулятор численности идентичных плазмид в одной клетке, но и активность продуцируемой за счет R-фактора пенициллиназы. Каков механизм этих изменений, сказать трудно. Сдвиг ферментной активности может быть связан, с одной стороны, с уменьшением количества синтезируемого фермента, с другой — со снижением его удельной активности. То и другое вполне вероятно при попадании R-фактора в клетку, способную в значительной мере ограничивать и модифицировать функцию чужеродной ДНК. Нельзя исключить также и мутационную изменчивость R-детерминантов (по типу замен и вставок), которая, хотя и редко, может привести к формированию мутантных R-факторов с искажением генетической информации и последующим синтезом неактивного белка вместо инактивирующего, или дефектного, фермента, в той или иной степени снизившего свою активность. Бактерии с таким R-фактором либо будут чувствительны к соответствующему антибиотику, либо значительно менее устойчивы к нему, чем если бы они несли неизмененный R-фактор.

Данные литературы о механизмах регуляции уровней внехромосомной резистентности крайне скудны. С нашей точки зрения, этот вопрос нуждается в дальнейшей разработке.

Недавно нам (С. А. Лебедева и др., 1973) удалось продемонстрировать, что степень устойчивости чумного микроба, детерминированная R-факторами, в значительной степени зависит от присутствия в реципиентных бактериях генов антибиотикоустойчивости, локализованных на хромосоме. Было изучено 4 R-фактора с

различными наборами детерминант резистентности. В качестве реципиентов использовали хромосомные мутанты Y. pestis штаммов EV и 556/106 Otten, предварительно селекционированные по признаку устойчивости к канамицину, стрептомицину, бензилпенициллину, тетрациклину или левомицетину (табл. 14). У некоторых из этих мутантов была отмечена выраженная в разной степени перекрестная устойчивость к другим антибиотикам. Отдельные стрептомицинрезистентные варианты снизили свою чувствительность к кана- и мономицину, а устойчивые к последним препаратам мутанты были менее чувствительны к стрептомицину. Перекрестную устойчивость наблюдали в отношении тетрациклинов и левомицетина у мутантов, селекционированных на средах с одним из этих лекарственных препаратов.

Таблица 14

Степень резистентности к антибиотикам исходных штаммов чумного микроба и их антибиотикоустойчивых мутантов

Мутантные и исходные штаммы	Устойчивость к антибиотикам (в мкг/мл)					
	С	М	К	Л	Т	П
EV (НИИЭГ) — исходный	1,25	2,5	5	2,5	5	1,5
556/106 — исходный	2,5	5	5	2,5	5	3
EV-Sm^r	100	2,5	5	2,5	2,5	1,5
EV-Sm^r	4000	5	5	2,5	5	0,75
556/106-Sm^r	7000	10	5	2,5	5	1,5
556/106-Sm^r (Kan, Mon)^r	7000	30	20	2,5	10	3
EV-Lev^r (Tc^r)	1,25	2,5	5	25	50	6
556/106-Lev^r (Tc^r)	5	5	5	50	50	6
556/106-Kan^r (Sm, Mon)^r	10	150	200	1,25	10	1,25
556/106-Pen^r-1	2,5	2,5	—	1,25	10	120
556/106-Pen^r-2	2,5	5	—	2,5	5	120
EV-Tc^r (Lev)^r	1,25	2,5	1,25	10	100	30

Условные обозначения: С — стрептомицин, М — мономицин, К — канамицин, Л — левомицетин, Т — тетрациклин, П — бензилпенициллин. Устойчивость к ним обозначается соответственно: Sm^r, Mon^r, Kan^r, Lev^r, Tc^r, Pen^r. Sm^r — «основная» устойчивость, (Sm^r) — перекрестная устойчивость.

Все описанные выше мутанты скрещивали с донорами R-факторов. У полученных эксконъюгантов изучали отношение к антибиотикам на плотной питательной сре-

Та[illegible] 1[illegible]

Эффект совмещения хромосомных и внехромосомных детерминантов антибиотикоустойчивости в одной бактериальной клетке Y. pestis

Штаммы-мутанты	Изученные R-факторы	Устойчивость к антибиотикам (в мкг/мл)					
		С	К	М	Т	Л	П
EV-Sm^{r}	—	4 000			5	2,5	
EV — исходный	R_3, R_6, R_{AB}	1 000(2 000)			500—600	100—200	
EV-Sm^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	4 000	—	—	(600)—900	70—100	—
EV-Sm^{r}	—	100					
EV-Sm^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	3 000	—	—	—	—	—
№ 556-Sm^{r}	—	7 000			5	2,5	
№ 556 — исходный	R_3, R_6, R_{AB}	1 000(2 000)			500—(700)	100—200	
№ 556-Sm^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	7 000	—	—	(700)—(1000)	(70)—100	—
№ 556-Sm^{r} (Kan, Mon)^{r}	—	7 000	20	30			
№ 556 — исходный	R_3, R_6, R_{AB}	1 000(2 000)	10 000	8 000			
№ 556-Sm^{r} (Kan, Mon)^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	7 000	16 000	12 000—15 000	0	0	0
EV-Lev^{r} (Tc)^{r}	—				50	25	
EV-исходный	R_3, R_6, R_{AB}				500—(700)	100—200	
EV-Lev^{r} (Tc)^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	—	—	—	1 100—1 200	300—400	±
№ 556-Lev^{r} (Tc)^{r}	—				50	50	
№ 556 — исходный	R_3, R_6, R_{AB}				500—(700)	100—200	
№ 556-Lev^{r} (Tc)^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	—	—	—	1 100—1 200	300—400	±
№ 556-Kan^{r} (Sm, Mon)^{r}	—	10	200	150			
№ 556 — исходный	R_6, R_{AB}	1 000(2 000)	10 000	5 000—8 000			
№ 556-Kan^{r} (Sm, Mon)^{r}	R_6, R_{AB}	3 000	80 000	5 000—8 000	±	—	—
EV-Tc (Lev)^{r}	—				100	10	
EV — исходный	R_{85}				70	25	
EV Tc^{r} (Lev)^{r}	R_{85}	—	—	—	300	70—100	
№ 556-Pen^{r}-1	R_{85}, R_{AB}	±	—	—	—	—	±
№ 556-Pen^{r}-2	R_{85}, R_{AB}	±	—	—	—	—	±

Условные обозначения те же, что в табл. 14.

Цифры в скобках — степень устойчивости одного клона из 10 изученных; 0 — устойчивость не определялась; ± несущественное снижение или повышение суммарной устойчивости мутантов по сравнению с исходными штаммами, несущими R-факторы; значок — означает, что различий в устойчивости эксконъюгантов исходного штамма и мутантов не выявлено. R-факторы E. coli (устойчивость к антибиотикам): R_6 — к СТЛКМН; R_{AB} — к СТЛКМНП; R_3 — к СТЛ; R_{85} — к СТЛП. Степень устойчивости эксконъюгантов исходных штаммов Y. pestis, определяемая факторами R_6, R_{AB} и R_3, одинакова.

9 Заказ № 6541

Таблица 15

Эффект совмещения хромосомных и внехромосомных детерминантов антибиотикоустойчивости в одной бактериальной клетке Y. pestis

Штаммы-мутанты	Изученные R-факторы	Устойчивость к антибиотикам (в мкг/мл)					
		С	К	М	Т	Л	П
EV-Sm^r	—	4 000			5	2,5	
EV — исходный	R_3, R_6, R_{AB}	1 000(2 000)			500—600	100—200	
EV-Sm^r	R_3, R_6, R_{AB}	4 000	—	—	(600)—900	70—100	—
EV-Sm^r	—	100					
EV-Sm^r	R_3, R_6, R_{AB}	3 000	—	—	—	—	—
№ 556-Sm^r	—	7 000			5	2,5	
№ 556 — исходный	R_3, R_6, R_{AB}	1 000(2 000)			500 - (700)	100—200	
№ 556-Sm^r	R_3, R_6, R_{AB}	7 000	—	—	(700) - (1000)	(70)—100	—
№ 556-Sm^r (Kan, Mon)^r	—	7 000	20	30			
№ 556 — исходный	R_3, R_6, R_{AB}	1 000(2 000)	10 000	8 000			
№ 556-Sm^r (Kan, Mon)^r	R_3, R_6, R_{AB}	7 000	16 000	12 000—15 000	0	0	0
EV-Lev^r (Tc)^r	—				50	25	
EV-исходный	R_3, R_6, R_{AB}				500—(700)	100—200	
EV-Lev^r (Tc)^r	R_3, R_6, R_{AB}	—	—	—	1 100—1 200	300—400	±
№ 556-Lev^r (Tc)^r					50	50	

9 Заказ

№ 556-Sm^{r} (Kan, Mon)^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	7 000	16 000	12 000—15 000	0	0	0
EV-Lev^{r} (Tc)^{r}	—				50	25	

EV-исходный	R_3, R_6, R_{AB}				500—(700)	100—200	
EV-Lev^{r} (Tc)^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	—	—	—	1 100—1 200	300—400	±
№ 556-Lev^{r} (Tc)^{r}	—				50	50	
№ 556 — исходный	R_3, R_6, R_{AB}				500—(700)	100—200	
№ 556-Lev^{r} (Tc)^{r}	R_3, R_6, R_{AB}	—	—	—	1 100—1 200	300—400	±
№ 556-Kan^{r} (Sm, Mon)^{r}	—	10	200	150			
№ 556 — исходный	R_6, R_{AB}	1 000(2 000)	10 000	5 000—8 000			
№ 556-Kan^{r} (Sm, Mon)^{r}	R_6, R_{AB}	3 000	80 000	5 000—8 000	±	—	—
EV-Tc (Lev)^{r}	—				100	10	
EV — исходный	R_{85}				70	25	
EV Tc^{r} (Lev)^{r}	R_{85}	—	—	—	300	70—100	
№ 556-Pen^{r}-1	R_{85}, R_{AB}	±	—	—	—	—	±
№ 556-Pen^{r}-2	R_{85}, R_{AB}	±	—	—	—	—	±

Условные обозначения те же, что в табл. 14.

Цифры в скобках — степень устойчивости одного клона из 10 изученных; 0 — устойчивость не определялась; ± несущественное снижение или повышение суммарной устойчивости мутантов по сравнению с исходными штаммами, несущими R-факторы; значок — означает, что различий в устойчивости эксконъюгантов исходного штамма и мутантов не выявлено. R-факторы E. coli (устойчивость к антибиотикам): R_6 — к СТЛКМН; R_{AB} — к СТЛКМНП; R_3 — к СТЛ; R_{85} — к СТЛП. Степень устойчивости эксконъюгантов исходных штаммов Y. pestis, определяемая факторами R_6, R_{AB} и R_3, одинакова.

9 Заказ № 6541

де. Из каждого кросса методом случайной выборки отбирали по 10 клонов эксконъюгантов и определяли уровень их устойчивости на плотных средах по сравнению с аналогичными эксконъюгантами исходных штаммов. Опыты ставили в двух повторностях. Степень достоверности различий определяли с помощью критерия знаков. В ряде случаев наблюдали более выраженное повышение устойчивости, чем это можно было ожидать при суммации активности хромосомных и внехромосомных генов (табл. 15). Особенно эффективным оказалось совмещение разнолокализованных детерминантов резистентности к канамицину. Фактическая суммарная устойчивость эксконъюгантов мутанта более чем в 8 раз превышала ожидаемую. Достоверное возрастание устойчивости в 2—4 раза наблюдали в опытах с мутантами, резистентными к левомицетину (отечественный аналог хлорамфеникола), что совпадает с результатами некоторых исследований, проведенных на мутантах E. coli, устойчивых к хлорамфениколу и перекрестно — к тетрациклинам (Reeve, 1966; Sompolinsky, Samra, 1968).

В наших опытах отмечена зависимость уровней устойчивости от свойств реципиентных бактерий. Если хромосомная резистентность чумного микроба к стрептомицину была высокой (до 4000—7000 мкг/мл), то передача R-фактора со стрептомициновым маркером не сказывалась на ней и она оставалась на прежнем уровне, если низкой (например, перекрестная устойчивость канамицинустойчивых мутантов к стрептомицину была не более 20 мкг/мл, а некоторых стрептомицинрезистентных — 100 мкг/мл) — передача того же R-фактора сопровождалась эффектом совмещения, определявшим возрастание фактической суммарной резистентности в $1^1/_2$—3 раза. Интересно отметить, что устойчивость к канамицину после введения R-фактора увеличивалась независимо от того, была хромосомная резистентность к этому антибиотику «основной» (т. е. мутант селекционировали с помощью канамицина) или перекрестной (например, у вариантов, селекционированных мономицином или стрептомицином). В случае мономицина она изменялась иначе. У мутантов, селекционированных на среде с канамицином или мономицином, после передачи R-факторов с мономициновым маркером степень устойчивости к мономицину была на «хромосомном» уровне

(если последний превышал «эписомный») или на «внехромосомном» (если он был выше «хромосомного»), т. е. на том уровне, который при совмещении разнолокализованных генов мономицинустойчивости оказывался максимальным. У стрептомицинустойчивых мутантов, перекрестно резистентных к малым концентрациям мономицина (50 мкг/мл), введение R-фактора с мономициновым маркером вызывало неадекватное повышение суммарной резистентности к мономицину. Эти данные наводят на мысль о возможности функционирования разных механизмов устойчивости к мономицину у описанных мутантов. Дальнейшее их изучение, с нашей точки зрения, представит значительный интерес.

Следует подчеркнуть, что в большинстве опытов неадекватное увеличение степени суммарной устойчивости после передачи R-факторов наблюдалось у мутантов с невысоким уровнем резистентности к тому или другому антибиотику (20—250 мкг/мл). На легкость ассоциации функций R-фактора и генов, определяющих начальные одноступенчатые изменения хромосомной антибиотикоустойчивости, указывают Reeve (1966), а также Pearce и Meynell, наблюдавшие неадекватное повышение (почти в 100 раз) устойчивости к стрептомицину после передачи R-фактора со стрептомициновым маркером хромосомным мутантам E. coli с невысокой резистентностью к этому антибиотику (Pearce, Meynell, 1968b). Но, видимо, такое явление не закономерно. В наших опытах хромосомные мутанты, резистентные к бензилпенициллину, несмотря на то, что они были нечувствительны лишь к 60—120 мкг/мл антибиотика (рост бактерий исходного штамма подавлялся 3 мкг/мл), вели себя иначе. После передачи соответствующих R-факторов с пенициллиновым маркером данным мутантам их устойчивость к бензилпенициллину была как у исходных штаммов, получивших те же R-факторы.

Результатов этих исследований и данных литературы не достаточно для объяснения описанного феномена. Пока можно высказать лишь общие предположения. Видимо, такой эффект можно наблюдать при синергидном действии нескольких механизмов, обеспечивающих лекарственную устойчивость: 1) при инактивации антибиотика за счет R-фактора на фоне снижения проницаемости клеточной стенки бактерий за счет мутаций, локализованных в хромосоме, 2) при синергидном взаи-

модействии инактивирующих антибиотики ферментов, синтез которых детерминирован как хромосомными, так и внехромосомными генами, 3) при снижении чувствительности к антибиотикам белкового синтеза бактерий, которое может возникать в результате мутаций, локализованных на хромосоме, и параллельной инактивации лекарств и, наконец, 4) при том же снижении чувствительности белкового синтеза и изменении проницаемости клеточной стенки за счет R-фактора.

Ginoza и Painter (1964) пытались объяснить эффект неадекватностного увеличения суммарной (внехромосомная+хромосомная) устойчивости к стрептомицину возможным присутствием «гена-мутатора», определяющего генетическую нестабильность хромосомы при взаимодействии с R-факторами и возрастание частоты мутаций к антибиотикоустойчивости у бактерий-носителей. Эту точку зрения оспаривают Pearce и Meynell (1968b), которые считают, что роль R-фактора в данной ситуации сводится к тому, что он обеспечивает начальное размножение микроорганизмов на селективной среде с антибиотиком до такой плотности популяции, когда становится возможным появление антибиотикоустойчивых мутантов.

Детальные исследования механизмов антибиотикоустойчивости позволят определить истинные причины выявленного феномена.

Наибольшее число работ по изучению механизмов внехромосомной множественной лекарственной устойчивости выполнено на модели кишечной палочки, стафилококка и некоторых других видов микроорганизмов. Аналогичные исследования на чумном микробе представлены только несколькими публикациями.

С. А. Лебедевой и Б. Н. Мишанькиным (1972), а также С. А. Лебедевой с сотр. (1972) показано, что, воспринимая соответствующий R-фактор от кишечных бактерий, чумной микроб приобретает способность инактивировать антибиотики, в частности пенициллин и левомицетин, аналогично тому, как это происходит в бактериях-донорах.

Domaradskij с сотр. (1971) провели сравнительное изучение инактивации левомицетина чумным микробом и кишечной палочкой при наличии в их клетках одного и того же R-фактора (устойчивость к стрептомицину, левомицетину, тетрациклину; донор E. coli JE 51). Ис-

следованию подвергались покоящиеся клетки, сферопласты, детрит и экстракты из клеток. Об инактивации 300 мкг/мл левомицетина судили по синтезу ацетилгидроксамовой (АГ) и п-аминобензойной (ПАБ) кислот, количество которых определяли колориметрически (табл. 16). Образование ПАБ было выражено слабо у обоих видов микроорганизмов. Способность к ее синтезу проявлялась в большей степени у чувствительного штамма кишечной палочки по сравнению с устойчивым. В отношении чумного микроба наблюдалось обратное: антибиотикочувствительные бактерии продуцировали несколько меньше ПАБ. Видимо, в данном случае этот путь инактивации не играет существенной роли в механизме устойчивости к левомицетину. Резистентные и чувствительные субкультуры E. coli и Y. pestis инактивировали антибиотик главным образом за счет образования АГ. У культур, лишенных R-фактора, инактивация протекала в 5—6 и более раз слабее, чем у резистентных. Сопоставление степени устойчивости бактерий обоих видов к левомицетину с интенсивностью его инактивации выявило прямую связь между этими характеристиками и обратную — между накоплением АГ и концентрацией активного антибиотика. Однако следует отметить, что только в течение первых 2 часов

Таблица 16

Уровень резистентности к левомицетину и интенсивность его инактивации у бактерий с R-фактором и без него [1]

Бактерии	Уровень устойчивости (в мкг/мл)	Концентрация (в мкг/мл) [2]		
		АГ [3]	ПАБ [4]	„остаточный" левомицетин
Y. pestis R^+	100–200	471	2,3	14
Y. pestis R^-	2,5–5	54	1,2	232
E. coli R^+	300–400	522	15,2	3
E. coli R^-	1,25—2,5	73	23,5	210

[1] Первоначальная концентрация левомицетина в пробах 300 мкг/мл.

[2] Данные представлены в виде средних, полученных по результатам шести экспериментов.

[3] Инкубация проб в течение 6 часов.

[4] Инкубация проб в течение 24 часов.

нарастание концентрации АГ в пробах было эквивалентно убыли левомицетина. При инкубировании проб более длительное время образование АГ превышало убыль левомицетина, что обусловливалось, по-видимому, ацетилированием не только первичного, но и вторичного гидроксила антибиотика. Судя по кинетике процесса, его можно отнести к реакциям второго порядка. Синтез АГ осуществлялся в 2—3 раза интенсивнее в аэробных условиях, хотя потребность в кислороде, видимо, не была связана непосредственно с инактивацией антибиотика, так как уровень дыхания бактерий в присутствии левомицетина и без него по существу не отличался. Ацетилирование антибиотика осуществляется ферментными системами, которые, по всей вероятности, локализуются в периплазматическом пространстве. Разрушение клеточной стенки при получении сферопластов приводило к снижению интенсивности инактивации, а при полной деструкции клеток значительную долю активности (около 20% ее у целых клеток) сохранял клеточный детрит. В экспериментах с бесклеточными экстрактами АГ или не обнаруживалась совсем, или выявлялась в незначительных количествах.

Таким образом, передача R-фактора от одного хозяина к другому качественного изменения механизма инактивации левомицетина в опытах Domaradskij с сотр. (1971) не вызывала, что согласуется с аналогичными данными о механизмах внехромосомной устойчивости к аминогликозидам и пенициллинам (Б. Н. Мишанькин и др., 1971; С. А. Лебедева и др., 1972). Отмеченные колебания количественного характера, видимо, следует отнести за счет возможных модификаций и ограничений плазмидной ДНК кишечной палочки в клетках Y. pestis.

В работе Ю. И. Кондрашина (1970) представлены результаты изучения характера инактивации аминогликозидных антибиотиков, включая мономицин, канамицин и неомицин. Показано, что экстракты клеток мутантов чумного микроба с хромосомной устойчивостью к мономицину обладают высокоспецифичной «мономициназой», в то время как фермент, синтезируемый клеткой с R-фактором, активен в отношении всех упомянутых аминогликозидов. Несколько иные данные получены Б. Н. Мишанькиным с соавт. (1971). В их опытах хромосомные мутанты штамма EV, устойчивые к ами-

ногликозидам, не инактивировали эти антибиотики. Напротив, бесклеточные экстракты из клеток того же штамма, несущих соответствующий R-фактор, проявляли способность к инактивации. Восстановить биологическую активность антибиотика после воздействия экстрактов удавалось обработкой опытных смесей щелочной фосфатазой. На этом основании авторы заключают, что инактивация аминогликозидов бактериями с изученным R-плазмидом происходит в результате их фосфорилирования.

В проведенных исследованиях учеными не обнаружено каких-либо принципиальных отличий в механизмах внехромосомной устойчивости чумного микроба и кишечной палочки, использованной в качестве донора R-факторов. Создается впечатление, что сущность процессов, детерминированных R-фактором, зависит в основном от их собственной специфики и в меньшей степени от свойств бактерий-носителей. Последние, видимо, определяют различия количественных характеристик функций R-плазмид. Однако этот вывод нуждается в более глубокой проверке с использованием нескольких R-факторов и большего числа реципиентов с различной видовой принадлежностью.

Значительное внимание в настоящее время уделяется изучению взаимодействия эписомных элементов и их взаимосвязи (Д. Г. Кудлай, 1969; Д. Г. Кудлай и др., 1972). На модели чумного микроба вопрос изучен мало. О. А. Проценко и П. И. Анисимов (1970) подтвердили обнаруженную ранее у кишечной палочки способность fi+-R-фактора E. coli CSH-2-R 222 подавлять фактор F-lac+. Совмещение этих плазмид в клетках Y. pestis приводило к утрате фертильных свойств эписомы F-lac+, хотя не влияло на фенотипическую экспрессию lac-оперона.

Е. Г. Кольцова и С. А. Лебедева (1969) установили индифферентные взаимоотношения между R-факторами fi+- и fi−-типов, с одной стороны, и фактором пестициногенности возбудителя чумы — с другой. К этому выводу авторы пришли на основании того, что частота передачи и характер фенотипического проявления факторов множественной лекарственной устойчивости у пестициногенных и непестициногенных штаммов Y. pestis были одинаковы. Более того, пестициногенные бактерии, имеющие и не имеющие R-фактор fi+- или fi−-ти-

па, продуцировали одинаковое количество пестицина как спонтанно, так и после индукции. Такие взаимоотношения, по мнению Meynell с сотр. (1968), свидетельствуют об отсутствии генетической гомологии между данными внехромосомными элементами, обычно выявляемой на основании иммунитета к суперинфекции или последующего ограничения функций одной из введенных в клетку плазмид.

Аналогичные ситуации возникают при совмещении R- и Col-факторов, однако не всегда. Иногда эти элементы находятся в состоянии эпистаза (Lawrence, Mulczyk, 1965). Эпистатические отношения известны при совмещении в одной клетке двух R-факторов, принадлежащих к типу fi+. В таком случае один из факторов либо не способен инфицировать бактерии, либо после попадания в них интенсивно элиминируется. При совмещении двух R-плазмид разных типов (fi+ и fi−) обычно между ними возникают индифферентные отношения.

Однако С. А. Лебедева с сотр. (не опубликовано) обнаружили антагонизм этих типов R-факторов в клетках чумного микроба. R-факторы вводились последовательно один за другим при скрещивании бактерий чумы с соответствующими донорскими штаммами кишечных бактерий. Присутствие fi− R-факторов в реципиентных клетках возбудителя чумы не влияло на частоту последующей передачи fi+-факторов. Однако при хранении и пересевах на питательных средах эксконъюгантов, содержащих одновременно fi− и fi+-R-факторы, fi+-R-факторы интенсивно элиминировались из клеток чумного микроба и, за редким исключением, не определялись уже через 1 месяц хранения. Будучи же «в одиночестве» (контрольная группа эксконъюгантов), они сохранялись в течение года и более. Культивирование на среде с комбинацией антибиотиков обеспечивало селекцию обоих R-факторов и обусловливало возникновение более стабильных комплексов R-плазмид. В процессе утраты fi+-R-факторов формировались сегреганты, стойко сохраняющие fi−-R и детерминанты стрептомицин- и тетрациклинустойчивости fi+-R. В связи с этим возникло предположение о рекомбинации двух R-факторов.

Поскольку данные С. А. Лебедевой и сотр. о характере взаимоотношений изученных fi+- и fi−-R-плазмид отличаются от литературных, авторами высказаны два предположения: либо изученный fi−-R-фактор явля-

ется не истинным fi⁻ (I-подобным), а мутантом fi⁺ (F-подобного фактора), либо выявлен новый для исследователей тип взаимодействия fi⁺- и fi⁻-R-факторов. Окончательное решение этого вопроса крайне желательно для понимания того, имеем ли мы дело с принципиально новым явлением, присущим только возбудителю чумы, или с частным случаем уже известного ранее феномена.

Предполагают (см. Д. Г. Кудлай, 1969), что R-фактор обычно находится в автономном состоянии, вне связи с хромосомой. С приобретением фактора множественной лекарственной устойчивости микроорганизмы, как правило, не изменяют своих видовых свойств. Аналогичным образом ведут себя и чумные микробы, получившие R-факторы от кишечных бактерий (С. А. Лебедева, 1969; П. И. Анисимов, А. А. Синичкина, 1969). Однако имеются данные Sugino и Hirota (1962), Pearce и Meynell (1968a) о том, что R-факторы могут присоединяться к хромосоме E. coli и обеспечивать перенос хромосомных маркеров, подобно F-факторам.

Способность R-фактора переносить хромосому на модели чумного микроба почти не изучена. Можно упомянуть лишь о работе П. И. Анисимова и А. А. Синичкиной (1969), которые обнаружили, что два рекомбинанта чумного микроба (из 32 изученных) приобрели от кишечной палочки способность ферментировать сорбит — характерный признак донорского штамма E. coli, но не Y. pestis.

Принимая во внимание данные Sugino и Hirota (1962), Pearce и Meynell (1968a), а также П. И. Анисимова и А. А. Синичкиной, можно с определенной долей вероятности сказать, что изучение свойства R-фактора переносить хромосому окажется полезным для решения вопросов, связанных с картированием хромосомы чумного микроба и анализом особенностей, обусловленных наличием в клетках R-факторов.

Пестициногенный фактор. Многие виды микроорганизмов способны продуцировать бактериоцины — вещества, угнетающие рост чувствительных к ним бактерий того же вида или рода.

В генетическом отношении это явление наиболее изучено у кишечных бактерий, у которых синтез бактериоцинов детерминирован колициногенными факторами (Col-факторы), отнесенными к эписомам (Д. Г. Кудлай, 1969). Среди Col-факторов обнаружены такие, которые могут вызывать конъюгацию бактерий и переходить из клетки в клетку самостоятельно, как например Col. I. Другие

Col-факторы, будучи трансмиссибельными, нуждаются в присутствии дополнительных внехромосомных элементов (F, F-lac+, R), способных детерминировать конъюгацию (см. Д. Г. Кудлай, 1969).

Бактериоциногения у чумного микроба (пестициногения) впервые была описана Ben-Gurion и Hertman в 1958 г. и в генетическом отношении все еще очень мало изучена. Основные работы по пестициногении рассмотрены сравнительно недавно в монографии И. В. Домарадского (1971), поэтому здесь приводятся лишь последние сведения о возможности конъюгационной передачи пестициногенного (Pg) фактора.

До последнего времени исследователям не удавалось передать Pg-фактор непестициногенным клеткам при их контакте с Pg+-бактериями Y. pestis. Проведенные Е. Г. Кольцовой (1970) опыты по изучению возможности передачи пестициногенности оказались также безрезультатными. В этих опытах в качестве донора применяли стрептомицинчувствительный пестициногенный штамм EV, а реципиентами служили стрептомицинрезистентные мутанты непестициногенных штаммов чумного микроба. Скрещивание проводили по методике Фредерика (см. Д. Г. Кудлай, 1969). Бактерии донорского штамма элиминировали стрептомицином. После скрещивания исследовали около 10^5 клеток каждого штамма-реципиента. Выявить пестициногенные рекомбинанты ни в одном случае не удалось. В связи с этим возникло предположение: либо Pg-фактор передается значительно реже, чем 10^{-5}, либо он не обладает детерминантами фертильности. Исходя из второго допущения, была предпринята попытка передать Pg-фактор при конъюгации чумных бактерий, опосредованной fi−-R-плазмидом (Е. Г. Кольцова и др., 1971). Такой подход оправдывался тем, что ранее было показано отсутствие влияния этого R-фактора на пестициногенную активность чумных бактерий (Е. Г. Кольцова, С. А. Лебедева, 1969).

Реципиентами служили устойчивые к стрептомицину мутанты непестициногенных штаммов Y. pestis. Один из них (№ 1706) был чувствителен к пестицину, другие (№ 117, 158, 167, 487, 753, 780) были устойчивы к нему. Донором был пестициногенный штамм EV, которому предварительно при скрещивании по методике Кнаппа и Лебека (Knapp, Lebek, 1967) передали fi−-R-фактор устойчивости к пенициллинам от небактериоцино-

генного варианта Shigella newcastlei. Рекомбинанты селекционировали на среде со стрептомицином и пенициллином. Возможность влияния мутационной изменчивости на результаты исключалась соответствующими контролями и последующим анализом неселективных признаков у предполагаемых рекомбинантов.

В процессе скрещивания пестициногенного донора, обладающего фактором лекарственной устойчивости, и всех непестициногенных реципиентов получены рекомбинанты с R-фактором. Частота их выявления у разных штаммов колебалась в пределах 10^{-6}—10^{-2}. При определении пестициногенности антибиотикоустойчивых вариантов обнаружено, что некоторые из них получили при конъюгации не только R-фактор, но и способность продуцировать пестицин. Передача пестициногенности при конъюгации, опосредованной фактором множественной лекарственной устойчивости, воспроизведена на всех использованных реципиентных штаммах чумного микроба.

Обнаруженная возможность передачи фактора пестициногении при конъюгации, обусловленной R-эписомой, не дает ответа на вопрос о способности Pg-фактора детерминировать конъюгацию клеток и собственный перенос от донора реципиенту.

Возникает вопрос, каков механизм этой передачи. Сводится ли роль R-фактора только к тому, что он обеспечивает формирование конъюгационных мостиков, или, кроме того, находясь в сцеплении с Pg-элементом, он переносит его аналогично тому, как это происходит с lac-опероном в F-lac^{+}.

Е. Г. Кольцова с сотр. (1971) определяли пестициногенность у 219 Pg^{+}R^{+}-рекомбинантных клонов возбудителя чумы, утративших R-фактор спонтанно и после воздействия додецилсульфатом натрия (до 35% клеток в популяции). Все они сохранили признак Pg^{+}. Видимо, R- и Pg-детерминанты функционируют независимо друг от друга и передаются самостоятельно при конъюгации, обусловленной R-фактором.

Предполагают, что Pg-фактор локализован в клетке вне хромосомы, подобно Col-факторам кишечных бактерий. В пользу такого предположения говорит выявленная возможность мобилизации Pg-детерминанта на перенос. Кроме того, показано, что передача признаков R^{+}Pg^{+} от штамма Y. pestis R^{+}Pg^{+} реципиентам

R^- Pg^- того же вида не сопровождалась передачей каких-либо свойств, детерминированных хромосомными генами (Е. Г. Кольцова, 1970). Этот факт, как и возможность элиминации Pg-фактора под действием УФ-радиации (Г. Ю. Пак, 1969), свидетельствует о большей вероятности его автономного существования.

Однако Little и Brubaker (1972) не удалось обнаружить плазмидную ДНК, с которой могут быть ассоциированы такие признаки возбудителя чумы, как синтез VW-антигенов, фракции I, способность к образованию пестицина и адсорбции пигментов. Сделано заключение: либо эти признаки локализованы на хромосоме, либо плазмидная ДНК не могла быть обнаружена использованным методом центрифугирования в градиенте плотности этидиумбромидхлорида цезия.

Пестициногенность включена в число признаков, связанных с вирулентностью. Ряд авторов, работы которых описаны в монографии И. В. Домарадского (1971), а также Г. Ю. Пак (1969), полагают, что существует тесная зависимость между Pg-признаком возбудителя чумы и его фибринолитической и коагулазной активностью. Установлено, что утрата пестициногенности и коагулазной и фибринолитической активности происходит одновременно. Возникает вопрос, представлены ли эти детерминанты в виде целостного Pg-фактора с единым регуляторным центром или характер их проявления и утраты обусловлен лишь тесным сцеплением соответствующих оперонов на ДНК Pg-фактора. Особый интерес приобретают исследования Pg^+-рекомбинантов, проведенные Е. Г. Кольцовой с сотр. (1971). У 76 рекомбинантов различных штаммов Y. pestis, получивших при конъюгации способность продуцировать пестицин (Pg), определяли наличие коагулазной (C) и фибринолитической (F) активности. Оказалось, что большинство из них приобрели от донора все три признака (Pg^+, C^+, F^+), а четыре — только один (Pg^+). Такой характер передачи изученных свойств при скрещивании, по мнению авторов, позволяет предположить детерминированность пестициногенной и коагулазно-фибринолитической активности разными оперонами. Довольно высокая частота совместной передачи признаков Pg^+, C^+, F^+ может указывать на близкое расположение их детерминантов в плазмиде. Остается пока неясным характер взаимодействия и сцепления детерминантов коагулазной и фибри-

нолитической активностей, коррелятивная связь которых была установлена И. В. Домарадским с сотр. (1962).

Е. Г. Кольцовой (1970) удалось передать Pg-фактор не только чумному микробу, но и возбудителю псевдотуберкулеза и кишечной палочке. Y. pestis и Y. pseudotuberculosis, за редким исключением (см. выше), приобретали признаки Pg^+, C^+, F^+, в эксконъюгантах кишечной палочки экспрессировалась лишь способность продуцировать пестицин. Коагулазная и фибринолитическая активности не проявлялись. Передача Pg-фактора патогенным и непатогенным видам бактерий, а также возможность отделения Pg^+ от детерминантов синтеза коагулазы и фибринолизина позволят провести ряд исследований по уточнению роли каждого из этих признаков в проявлении вирулентности.

Вопросы вирулентности чумного микроба уже разбирались ранее И. В. Домарадским (1966), И. Л. Мартиневским (1969). Затронуты они и в монографии В. Г. Петровской (1967). Поэтому вряд ли целесообразно рассматривать их здесь столь же подробно. За последние годы мало что изменилось во взглядах на проблему. Следует лишь, видимо, еще раз подчеркнуть, что роль так называемых детерминантов вирулентности нуждается в некоторой переоценке, поскольку известны случаи выделения вирулентных мутантов, утративших отдельные детерминанты или их сочетания (VW^-, P^-, $F1^-$, T^-, Ca^+) (см. П. И. Анисимов, 1968).

Современное состояние проблемы вирулентности чумного микроба в достаточной степени отражено в последнем обзоре Brubaker (1972).

Обобщая материалы многих исследователей, автор делает вывод, что проявление вирулентности, по всей вероятности, связано со свойствами возбудителя подавлять пролиферацию ретикулоэндотелиальной системы, нейтрализовать ее антибактериальную активность и выживать внутри фагоцитов.

Резистентность к фагоцитозу фенотипически проявляется через несколько часов инкубации при 37° или in vivo до образования морфологически различимой капсулы. Решающую роль в этом играет фракция I. Значение же V- и W-антигенов до сих пор остается неясным. Подращивание мутантов, лишенных VW, при 37° приводит к появлению нормальной резистентности к

фагоцитозу, тогда как дефект по синтезу F1 определяет сохранение чувствительности в тех же условиях. Трудности в определении роли V- и W-антигенов состоят также в том, что, судя по результатам опытов in vitro, их накопление происходит при 37° в неразмножающихся культурах, стаз которых обусловлен отсутствием ионов Ca^{++}. Известно, что в плазме крови и межклеточных пространствах концентрация Ca^{++} достаточна для размножения, и только внутри фагоцитов, где отсутствуют ионы Ca^{++}, создаются подходящие условия для синтеза VW. Если признать Ca-зависимость атрибутом вирулентных клеток, внутри фагоцитов должен происходить стаз захваченных вирулентных клеток, так необходимый для синтеза VW-антигенов. Однако установлено внутриклеточное размножение возбудителя и вряд ли это Ca-независимые авирулентные клетки. Можно предположить, что снижение напряжения кислорода в тканях, наблюдаемое в макроорганизме в первичных и вторичных очагах, уменьшает или снижает зависимость от Ca^{++}, так как последняя четко проявляется в условиях аэрации, либо следует согласиться с мнением Brubaker (1972), что накопление V- и W-антигенов в период первоначального стаза может приводить к фенотипическим изменениям метаболизма возбудителя, что и определяет его способность выживать внутри фагоцитов. Wainberg (цит. по Brubaker, 1972) относит VW к вторичным метаболитам, накапливающимся в результате блока, возникающего в отсутствие Ca^{++} при 37°. Это вполне вероятно, поскольку в таких условиях уже можно считать установленным возникновение блока некоторых функциональных систем, в частности тех, которые ответственны за инвагинацию и формирование межклеточных перегородок при делении. Такой блок в свою очередь приводит к прекращению размножения возбудителя. Однако, если отводить VW-антигенам подобную роль, трудно ответить на вопрос, какой фактор способствует выживанию в процессе фагоцитоза вирулентных клеток, дефектных по синтезу этих антигенов. Не придавать же им особого значения также нельзя, ведь известно (см. Brubaker, 1972), что моноспецифические анти-V-сыворотки обеспечивают пассивную защиту мышей от экспериментальной чумы.

Пигментообразование в настоящее время рассматривают как своего рода защитный механизм для вы-

живания вне фагоцитов. Ионы железа ингибируют антибактериальные элементы сыворотки, в том числе и комплемент. Поэтому вполне вероятно, что клетки с адсорбированными на поверхности ионами железа менее доступны действию антибактеринов сыворотки. Возможно также, что такие клетки представляют собой и меньший раздражитель для ретикулоэндотелиальной системы, однако прямых доказательств этому пока нет.

Даже неполные сведения, приведенные здесь и характеризующие некоторые стороны современного состояния проблемы вирулентности чумного микроба, свидетельствуют о том, что выяснение вопросов, связанных с этим важным свойством возбудителя, далеко от завершения.

Проблема нуждается в дальнейшем изучении при использовании новых подходов и условий, максимально приближенных к тем, в которых возбудитель функционирует в макроорганизме, вызывая инфекцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Попытаемся подвести итоги и наметить перспективы исследований по физиологии и генетике чумного микроба.

Суммируя данные работ, приведенных в книге, можно сказать, что на сегодняшний день по многим вопросам удалось значительно продвинуться вперед. Так, в общих чертах определены основные направления метаболизма чумного микроба. Немало сделано в области изучения питательных потребностей и дыхания. Выяснены и частично исследованы ферментные системы, принимающие участие главным образом в обмене белков и углеводов. Возникло функционально-морфологическое направление в изучении метаболизма. Подобраны эффективные мутагены и оптимальные условия их действия. Создан музей разнообразных мутантов. Намечены подходы к картированию хромосомы. Начаты поиски характерных путей передачи генетической информации. Экспериментально получено несколько типов эксконъюгантов, среди которых основное место занимают рекомбинанты с R-факторами.

Однако не везде дело обстоит так гладко, некоторые вопросы еще требуют значительных доработок, а другим вообще не уделялось внимания.

Крайне скудны сведения по регуляции обмена веществ. Недостаточно исследованы процессы биосинтеза белков и нуклеиновых кислот. Еще хуже изучен синтез углеводов и липидов. Отсутствуют какие-либо материалы о механизме транспорта питательных веществ в клетки.

Данные по биохимии подчас весьма противоречивы. Исследователи по-разному подходят к оценке активности отдельных ферментных систем или даже целых процессов у вирулентных и авирулентных штаммов; в этом

отношении мало что изменилось по сравнению с тем, что было известно к 1966 г. (см. «Очерки патогенеза чумы» И. В. Домарадского). Нуждаются в уточнении результаты изучения потребности в аминокислотах, витаминах и других факторах роста, поскольку в большинстве случаев для опытов используют разные штаммы, применяют разные методы учета и, что особенно важно, проводят эксперименты в неодинаковых условиях.

По-прежнему мы мало знаем о биохимических аспектах взаимоотношения между чумным микробом и организмом его хозяев. Те сведения, которыми мы располагаем, ни в коей мере не способствуют ответам на многочисленные вопросы. Особый интерес представляет выяснение биологической целесообразности изменения обмена веществ возбудителя при варьировании температуры его культивирования. Небезынтересно напомнить, что эти изменения идут как под знаком «минус», так и под знаком «плюс», т. е. снижение активности одних систем и утрата тех или иных признаков сопровождается повышением активности других систем и появлением новых свойств. По-видимому, изменения метаболизма возбудителя — результат его адаптации к организму хозяина. Утрата некоторых ферментов, связанная, в частности, с повышением потребности в факторах роста, может быть одним из выражений принципа «экономии» и в живой природе, поскольку микроб попадает в условия, обеспечивающие его всем необходимым. В свою очередь «сэкономленная» энергия тратится на образование факторов вирулентности, которые с позиций микроба следует рассматривать как факторы защиты.

Здесь, как и при решении многих других проблем чумы, мы сталкиваемся с изменчивостью чумного микроба. Ее диапазон был и отчасти остается предметом многочисленных дискуссий. Однако до середины 50-х годов мы не имели материальной основы для ее научного анализа. Поэтому сейчас нам представляется более животрепещущим детальнее обсудить данные по генетике Y. pestis, чем различные аспекты ее биохимии.

Прежде всего о генетических рекомбинациях. Пока их изучение находится в начальной стадии.

Способность к трансформации нельзя считать доказанной, хотя и отрицать ее вряд ли правильно, учиты-

вая результаты опытов Г. М. Орловой с сотр. (1971). Необходимы новые усилия для выяснения того, проникает ли изолированная ДНК в клетки чумного микроба (т. е. действительно ли мы имеем дело с трансформантами) и каковы условия, обеспечивающие их компетентность (если она есть).

Как видно из материалов главы II, утверждение о наличии лизогении у возбудителя чумы кажется недостаточно обоснованным. Проблема трансдукции также нуждается в проверке и доработках. Крайне необходимо быстрейшее выяснение истинной природы фагов, выделенных Н. Н. Новосельцевым и В. С. Лариной, и возможной роли чужеродных фагов в процессе трансдукции.

Недостаточно обосновано мнение об отсутствии собственной половой дифференциации у чумного микроба, поскольку оно строилось на аналогиях с кишечной палочкой и использовании ее фагов φ II и f_2. Так или иначе, но пока передачи собственной генетической информации путем конъюгации клеток у чумного микроба никому наблюдать не удалось.

Немалый теоретический и практический интерес представляет возможность передачи чумному микробу полового фактора кишечной палочки. Правда, сейчас можно только гадать, какие перспективы открывает подобная возможность. Приобретение клетками чумного микроба F-эписомы превращает их в особи «мужского» типа. Не исключено поэтому, что использование для указанного превращения F-эписом различных типов, в том числе и мутантных, окажется полезным хотя бы для картирования хромосомы Y. pestis и изучения передачи способности продуцировать антигены.

Более существенные успехи достигнуты по передаче другого внехромосомного элемента — R-фактора. Особенно важно, что с помощью R-фактора (типа fi^-) удалось осуществить перенос от одних клеток чумного микроба другим Pg-фактора, который сам по себе, вероятно, не трансмиссивен. Кроме того, создались предпосылки, частично уже реализуемые, для изучения механизмов лекарственной устойчивости и фенотипической экспрессии соответствующих детерминантов R-факторов у возбудителя чумы.

Однако и в этом направлении еще многое предстоит сделать.

Перечислим несколько задач, решения которых в равной мере в ближайшее время можно ожидать с помощью F⁻-, R- или Pg-факторов:

1. Установление диапазона восприимчивости клеток к гетерологичным ДНК и механизмов их проникновения с учетом степени гомологии ДНК эписом и хромосомы.

2. Детальное изучение модифицирующего и ограничивающего действия клеток новых хозяев на чужеродную ДНК.

3. Выяснение роли упомянутых выше факторов переноса в изменении фенотипа и генотипа и значения их в плане эволюции возбудителя чумы.

4. Определение «емкости» микробных клеток для различных сочетаний внехромосомных элементов.

5. Подбор методов и условий для передачи чумному микробу различных плазмид грампозитивных бактерий.

Отдельно следует рекомендовать поиски специфических для Y. pestis экстрахромосомальных элементов, особенно тех, которые имеют отношение к ее вирулентности и иммуногенности.

Переходя к проблемам мутагенеза, отметим прежде всего, что реализация возможностей, которые представляет мутагенез, является функцией разработки методов селекции, что в свою очередь упирается в необходимость углубленного изучения различных сторон метаболизма бактерий. К сожалению, мы умеем пока отбирать преимущественно ферментативные, прото-, ауксотрофные, а также антибиотикоустойчивые мутанты чумного микроба. Методы селекции мутантов других типов нуждаются в разработке. Кстати, такое же положение имеет место и с рекомбинантами.

Нерешенными остаются вопросы о пределах мутационной изменчивости, репарации поврежденной мутагенами ДНК и специфичности мутагенеза.

Очень мало известно о том, идентичны ли по другим свойствам однотипные мутанты, например соответствующие ауксотрофные индуцированные и спонтанные. Не отработаны методы идентификации истинных и супрессорных обратных мутаций.

В плане картирования сделаны только первые шаги.

Наконец, совершенно забытым оказалось такое важное направление в изучении чумного микроба, как по-

пуляционная генетика, без чего затрудняется анализ взаимоотношения клеток, селекционной роли среды, влияния временных факторов и метаболитов на поведение популяции в целом и особей, входящих в ее состав.

Хочется надеяться, что в самое ближайшее время мы станем свидетелями новых больших достижений в генетике и биохимии чумного микроба. Они снимут ряд поставленных нами проблем и прояснят новые пути, по которым пойдет борьба ученых с инфекцией, веками сопутствующей человеку.

ЛИТЕРАТУРА [1]

Аванян Л. А., Губина Н. Е. Действие железа на рост чумного микроба. Труды Армянск. противочумной станции. В. I. Ереван, 1960, с. 149.

Аванян Л. А., Губина Н. Е. Действие железа на рост и вирулентность чумного микроба. Ж. микробиол., 1961, № 3, с. 92.

Акименко В. Г. Сравнительная химическая характеристика вирулентного и авирулентного штаммов чумного микроба. Автореф. канд. дисс. Ростов-на-Дону, 1955.

Алешина Е. Н., Бибикова А. Д. Распределение чумного бактериофага в организме морской свинки. Рефераты научно-исслед. работ. Ростовск. научно-исслед. противочумный ин-т. Т. 8. Ростов-на-Дону, 1949, с. 97.

Алимова Е. К., Бойкова Е. А. Жирнокислотный состав липидов чумного микроба. Биохимия, 1967, т. 32, № 2, с. 210.

Анисимов П. И. Перспективы развития генетики вирулентности чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1968, № 4, с. 50.

Анисимов П. И., Ларина В. С. Лизогения у чумного микроба и феномен трансдукции на этой модели. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971, № 2, с. 5.

Анисимов П. И., Синичкина А. А. Эписома множественной лекарственной устойчивости бактерий кишечной группы и особенности передачи этого фактора на модели чумного микроба методом конъюгации. В кн.: Микробиология и иммунология особо опасных инфекций. Сборник работ противочумных учреждений. В. 3. Саратов, 1968, с. 113.

Анисимов П. И., Синичкина А. А. Элементы сцепления признаков при конъюгационной передаче эписомного R-фактора. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1969, № 3, с. 80.

Анисимов П. И., Синичкина А. А. Заметки к картированию R-эписомы. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 2, с. 51.

Анисимов П. И., Проценко О. А. Проблема пола у бактерий возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 6, с. 47.

---

[1] Приводятся лишь основные, обзорные и новые работы, по которым можно найти всех цитируемых в тексте авторов.

Анисимов П. И., Проценко О. А., Коннов Н. П., Шкель С. М. Структурные элементы, определяющие половую дифференциацию у возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 1, с. 92.

Бахрах Е. Э. Специфические полисахаридосодержащие комплексы чумного микроба. Материалы к конференции, посвященной 50-летию ин-та «Микроб». Саратов, 1968, с. 115.

Бахрах Е. Э., Башева В. С. Окислительно-восстановительный потенциал в культуре чумного микроба. Труды ин-та «Микроб». В. I. Саратов, 1951, с. 79.

Бахрах Е. Э., Вейнблат В. И. Выделение из типичных штаммов чумного микроба методом Буавена основного соматического антигена. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 1, с. 109.

Бахрах Е. Э., Егорова В. Д., Денисова Е. П. Распределение белка и полисахарида в клетках чумного микроба, выросшего при 28 и 37°. Ж. микробиол., 1964, № 10, с. 135.

Бахрах Е. Э., Егорова В. Д., Филиппов А. Ф. Влияние температуры выращивания на химический состав чумного микроба. Ж. микробиол., 1963, № 11, с. 29.

Бахрах Е. Э., Крайнова А. Н., Михайлова А. П. Зависимость роста чумного микроба от наличия в питательной среде азотистых веществ. Труды ин-та «Микроб». В. I. Саратов, 1951, с. 168.

Бахрах Е. Э., Кузьмиченко И. А., Егорова В. Д. О химическом составе субкультур чумного микроба и их вариантов со сниженной вирулентностью. В кн.: Биохимия микробов и иммунохимия. Материалы к конференции 18—20 апреля 1966 г. Горький, 1966, с. 101.

Бахрах Е. Э., Тараненко Т. М. Изучение химического состава аллергена пестина ПП. Сообщение I. Очистка пестина фильтрацией через гель сефадекса. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1968, № 2, с. 146.

Бахрах Е. Э., Шушерова Н. И. Зависимость роста чумного микроба от окислительно-восстановительного потенциала питательной среды. Труды ин-та «Микроб». В. I. Саратов, 1951, с. 92.

Безсонова А. А. Пептонная вода с рамнозой как дифференциальная среда для B. pestis и B. pseudotuderculosis rod. Pfeiffer'a. Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол., 1929, т. 8, в. 4, с. 458.

Беккер М. Л. Нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды бактерий чумы и некоторых других видов бактерий. Автореф. докт. дисс. Харьков, 1965.

Беккер М. Л. Регуляция биосинтеза пуриновых нуклеотидов нуклеиновых кислот у бактерий чумы. Биохимия, 1967, т. 32, № 3, с. 629.

Беккер М. Л., Куцемакина А. З. Нуклеопротеиды бактерий чумы при различных условиях выращивания. Вопр. мед. химии, 1960, т. 6, № 5, с. 506.

Белозерский А. Н., Спирин А. С. Химия нуклеиновых кислот микроорганизмов. В кн.: Нуклеиновые кислоты. Под ред. Э. Чаргаффа и Дж. Дэвидсона. М., 1962, с. 123.

Байкова Е. А. Жирнокислотный состав липидов чумных бактерий. Автореф. канд. дисс. Ростов-на-Дону, 1967.

Быстрекин А. И. К изучению химического состава B. pestis. Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол., 1940, т. 19, в. 3—4, с. 433.

Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК и его биологическое значение. Успехи совр. биол., 1968, т. 65, в. 2, с. 163.

Ванюшин Б. Ф., Дедиева Е. П., Мазин А. Л. и др. Некоторые свойства ДНК P. pestis EV. Научные докл. высшей школы. Биол. науки, 1970, № 12, с. 82.

Васильев Н. В., Юндин Е. В. Влияние некоторых микроэлементов на изменение вирулентности возбудителя чумы. В кн.: Особо опасные инфекции на Кавказе. Материалы 2-й научной конференции противочумных учреждений Кавказа по эпидемиологии, эпизоотологии, профилактике особо опасных инфекций. В. I. Ставрополь, 1970, с. 72.

Вейнблат В. И. Действие гликокола и некоторых других аминокислот на чумной микроб. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 3, с. 186.

Вейнблат В. И., Кузьмиченко И. А., Синичкина А. А., Борисова Н. П. Синтетическая питательная среда выращивания чумных микробов при 28 и 37°. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1972, № 4, с. 123.

Голубинский Е. П. Использование пуриновых и пиримидиновых производных чумным и псевдотуберкулезным микробами. Дисс. канд. Ростов-на-Дону, 1965.

Голубинский Е. П., Борзенкова В. И. Дегидрогеназы чумного микроба. Вопр. мед. химии, 1970, т. 16, № 3, с. 276.

Голубинский Е. П., Борзенкова В. И., Домарадский И. В. Дегидрогеназная активность чумного микроба. Материалы к 5-й объединенной научной конференции медицинского и научно-исследовательских институтов г. Ростов-на-Дону, ч. I. Ростов-на-Дону, 1968, с. 272.

Голубинский Е. П., Буравченко И. М. Использование углерода и азота пуриновых и пиримидиновых производных чумным и псевдотуберкулезным микробами. В кн.: Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. В. I. Изд. Ростовского университета, 1967, с. 225.

Голубинский Е. П., Губарева А. Е., Шелепин О. Е., Рублев Б. Д. Химический состав мембран чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1973а, № 2, с. 25.

Голубинский Е. П., Кирдеев В. К., Борзенкова В. И., Орлова Г. М. Получение и некоторые свойства мембранных структур клеток чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971а, № 2, с. 25.

Голубинский Е. П., Кирдеев В. К., Токарев С. А. Ультраструктура P. pestis. Ж. микробиол., 1971б, № 3, с. 13.

Голубинский Е. П., Николаенко Н. Т., Линникова Л. В. К вопросу о фосфатазной активности чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 5, с. 48.

Голубинский Е. П., Рублев Б. Д., Кирдеев В. К. Окислительное фосфорилирование у чумного микроба. Вопр. мед. химии, 1971в, т. 17, № 5, с. 512.

Голубинский Е. П., Рублев Б. Д., Кирдеев В. К., Сагатовский В. Н. Цитохромы чумного микроба. Вопр. мед. химии, 1973б, т. 19, № 1, с. 38.

Голубинский Е. П., Рублев Б. Д., Фрунзе О. В. Окисление промежуточных продуктов цикла Кребса и характер распада радиоактивной глюкозы у чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971 г., № 5, с. 87.

Голубинский Е. П., Тынянова В. И., Домарадский И. В. Использование глицерина чумным микробом. Вопр. мед. химии, 1972, т. 18, № 2, с. 194.

Грибоедов А. В. Полисахариды водно-солевого экстракта чумного микроба EV. Автореф. канд. дисс. Ростов-на-Дону, 1969.

Губарев Е. М., Болгова Г. Д., Пустовойтова О. И., Оленичева Л. С. Сравнительный нуклеотидный состав некоторых штаммов псевдотуберкулезных бактерий. В кн.: Биохимия микробов. Сборник трудов. Горький, 1964, с. 200.

Губарев Е. М., Ивановский Н. Н. Биохимия чумного микроба. М., 1958, с. 9.

Губарев Е. М., Липатова Т. Влияние некоторых анионов и катионов на рост B. pestis. Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол., 1930, т. 9, в. 4, с. 507.

Губина Н. Е., Аванян Л. А. Изучение каталазной активности и способности утилизировать железо различно пигментированными вариантами чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971, № 4, с. 198.

Дальвадянц С. М. Характеристика соматического антигена чумного микроба, изолированного из авирулентного, бескапсульного, атоксичного варианта, методом Буавена. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1968, № 2, с. 134.

Джапаридзе М. Н. Каталазная и пероксидазная активность чумного и псевдотуберкулезного микробов. Дисс. канд. Саратов, 1953.

Домарадский И. В. Аминокислотный обмен микробов чумы и псевдотуберкулеза. Дисс. докт. Саратов, 1955.

Домарадский И. В. К вопросу об обмене серусодержащих аминокислот в культурах микробов чумы. Ж. микробиол., 1957, № 6, с. 7.

Домарадский И. В. Общая характеристика обмена веществ чумного микроба. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока, 1958а, т. 18, с. 155.

Домарадский И. В. Дальнейшие наблюдения над способностью микробов чумы и псевдотуберкулеза к диссимиляции аминокислот. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та. Сибири и Дальнего Востока, 1958б, т. 18, с. 75.

Домарадский И. В. Очерки патогенеза чумы. М., 1966.

Домарадский И. В. Возбудители пастереллезов и близких к ним заболеваний. М., 1971.

Домарадский И. В., Башева В. С., Сидорова Н. К. Культивирование чумного микроба на средах известного состава. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока, 1958а, т. 18, с. 55.

Домарадский И. В., Бунтин Е. В., Захарова Г. А. Дегидразы микробов чумы и псевдотуберкулеза. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока. 1958б, т. 18, с. 83.

Домарадский И. В., Егорова В. Д. Об обмене цистеина в культурах чумного микроба. Вопр. мед. химии, 1959, т. 5, № 1, с. 60.

Домарадский И. В., Иванов В. А. Некоторые данные по культивированию чумного микроба на синтетических средах. Ж. микробиол., 1957, № 2, с. 54.

Домарадский И. В., Климова И. М. Антиальдолазная активность противочумной сыворотки и отличие альдолазы чумного микроба от его токсина. Бюлл. экспер. биол. мед., 1964, № 4, с. 84.

Домарадский И. В., Коробейник Н. В. О синтезе аспарагиновой кислоты чумным микробом. В кн.: Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. В I; изд. Ростовского университета, 1967, с. 200.

Domaradskiy I., Lebedeva S., Korobeihik N., Abramova L. Phenotypic expression of levomycetin (chloramphenicol) resistance factor in E. coli and P. pestis. 7th Intern. Congr. of Chemotherapy. Prague, Aug. 1971. Abstracts, v. 2, Praga, 1971, A—8/22.

Домарадский И. В., Линникова Л. В., Голубинский Е. П. Обмен глицерина у чумного микроба. Вопр. мед. химии, 1968а, т. 14, № 2, с. 185.

Домарадский И. В., Линникова Л. В., Таранова В. Н., Орлова Г. М. Изучение механизма окисления глицерина чумным микробом с позиций теории «последовательной индукции». В кн.: Диагностика особо опасных инфекций. Изд. Ростовского университета, 1968б, с. 242.

Домарадский И. В., Рыкова В. И., Ткаченко В. В. О лецитиназной активности микробов чумы и туляремии. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока, 1963, т. 25, с. 98.

Домарадский И. В., Семенушкина А. Ф. Некоторые данные об усвоении гликокола чумным микробом. Вопр. мед. химии, 1957, т. 3, № 1, с. 30.

Домарадский И. В., Семенушкина А. Ф. Использование углерода уксусной кислоты чумным микробом. Вопр. мед. химии., 1958, т. 4, № 1, с. 21.

Домарадский И. В., Яромюк Г. А., Васюхина Л. В., Коротаева А. В. Корреляция между фибринолитической активностью и способностью коагулировать плазму у чумного микроба. Докл. Иркутского противочумного ин-та. В. 4. Иркутск, 1962, с. 27.

Дроздовская Ф. К. Некоторые вопросы углеводно-фосфорного обмена микробов чумы и псевдотуберкулеза и влияние глюкозы на рост возбудителя чумы в условиях аэрации. Дисс. канд. Саратов, 1962.

Дроздовская Ф. К., Глушко Л. И. Изменение ТТХ-редуктазной активности в цикле развития аэрируемой культуры чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971, № 5, с. 109.

Дроздовская Ф. К., Муравьева Н. К., Глушко Л. И., Крайнова А. Н. К вопросу о биохимическом контроле производства живой противочумной вакцины. Сообщение 2. Изменение окислительно-восстановительного потенциала в процессе роста чумного микроба в условиях аэрации. В кн.: Производство бактерийных препаратов для профилактики и диагностики особо опасных инфекций. Изд. Саратовского университета, 1966, с. 16.

Дроздовская Ф. К., Муравьева Н. К., Крайнова А. Н. Влияние глюкозы на рост чумного микроба в условиях аэрации. В кн.:

Особо опасные и природноочаговые инфекции. Сборник научных работ противочумных учреждений. М., 1962, с. 197.
Егорова В. Д. Углеводные компоненты чумного микроба. Дисс. канд. Саратов, 1967.
Егорова В. Д., Домарадский И. В. К вопросу о диссимиляции некоторых аминокислот под влиянием чумного и псевдотуберкулезного микробов. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока, 1958, т. 18, с. 81.
Егорова В. Д., Домарадский И. В. О сахаридном составе полисахаридосодержащей фракции чумного микроба. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока, 1959, т. 20, с. 343.
Ефимцева Е. П. Экспериментальное исследование полисахаридсодержащих комплексов целых клеток и клеточных оболочек возбудителей чумы и мелиоидоза. Автореф. дисс. докт. Саратов, 1968.
Жуков-Вережников Н. Н., Пехов А. П. Генетика бактерий. М., 1963.
Иванов В. А. Влияние аминокислотного состава синтетических сред на вирулентность и иммуногенные свойства чумного микроба. Труды ин-та «Микроб». В. 3. Саратов, 1959, с. 107.
Ивановский Н. Н. О химическом составе чумного микроба. Распределение азота и фосфора по фракциям. Вестник микробиол., эпидемиол. и паразитол. Сборник научных трудов, посвящ. 25-летию ин-та «Микроб». Саратов, 1944, с. 19.
Ивановский Н. Н. Изменчивость углеводного обмена чумного микроба. Труды ин-та «Микроб». В. 1. Саратов, 1951, с. 61.
Ивановский Н. Н., Башева В. С. Химическая природа кислот, образующихся при росте чумного микроба на бульоне с d-глюкозой. Труды ин-та «Микроб». В. 1, Саратов, 1951а, с. 247.
Ивановский Н. Н., Башева В. С. Наблюдения над сравнительной интенсивностью разложения рамнозы чумным микробом и микробом ложного туберкулеза грызунов. Труды ин-та «Микроб», В. 1. Саратов, 1951б, с. 249.
Карпузиди К. С., Макаровская Л. Н. Рост и размножение чумного микроба на среде с лизатом микробов—«кормилок». Труды Ростовского-на-Дону гос. научно-исслед. противочумного ин-та. Т. 10, Астрахань, 1956, с. 44.
Кац Л. Н. О субмикроскопической структуре Pasteurella pestis Holland. Ж. микробиол., 1966, № 7, с. 84.
Классовский Л. Н. Изменчивость чумного микроба, вызванная действием рентгеновых лучей. Сообщение 1. Селекция колоний как метод выделения авирулентных вариантов из облученной популяции чумных бактерий. Труды Ср.-Аз. научно-исслед. противочумного ин-та. В. 6. Алма-Ата, 1959, с. 67.
Классовский Л. Н., Мартиневский И. Л., Степанов В. М. О факторах роста штаммов бактерий чумы, выделяемых на Закавказском нагорье от полевок и их блох. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1972, № 1, с. 186.
Классовский Л. Н., Терентьева Л. Н. О возможности получения устойчивых к стрептомицину форм микроба чумы с помощью препаратов ДНК. Материалы научной конференции по природной очаговости и профилактике чумы. Алма-Ата, 1963, с. 109.

Климова И. М., Домарадский И. В., Кротова В. А. β-Глюкозидаза чумного микроба и антиглюкозидазное действие чумной агглютинирующей сыворотки. Материалы конференции. Иркутск, 1967, с. 198.

Кольцова Е. Г. Некоторые свойства пестицина 1 и передача пестициногенного фактора in vitro. Дисс. канд. Ростов-на-Дону, 1970.

Кольцова Е. Г., Лебедева С. А. Фенотипическое проявление пестициногенного фактора в присутствии R-эписом кишечных бактерий: Материалы межинститутск. конференции по генетике — «Внехромосомные факторы наследственности у бактерий» 24—25 июня 1969 г. М., 1969, с. 42.

Кольцова Е. Г., Сучков Ю. Г., Лебедева С. А. Передача фактора бактериоциногенности у чумного микроба. Генетика, 1971, т. 7, № 4, с. 118.

Кондрашин Ю. И. Механизм устойчивости возбудителя чумы к мономицину. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 6, с. 53.

Кондрашин Ю. И., Анисимов П. И. Изучение возможности лизогенизации возбудителя чумы фагами кишечной группы. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 1, с. 116.

Коробейник Н. В. Синтез аспарагиновой и фумаровой кислот чумным микробом и другими представителями рода Pasteurella. Дисс. канд. Ростов-на-Дону, 1968.

Коробейник Н. В., Домарадский И. В. Выделение, очистка и каталитические свойства аспартазы чумного микроба. Биохимия, 1968, т. 33, с. 1128.

Коробкова Е. И. К изучению B. pestis и B. pseudotuberculosis rodentium Pfeiffer. Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол., 1929, т. 8, в. 4, с. 435.

Коробкова Е. И. Действие гликокола на чумной микроб. Труды ин-та «Микроб», В. 4, Саратов, 1960, с. 121.

Коробкова Е. И., Лискина И. В. Использование редукции метиленовой сини для определения in vitro вирулентности чумного микроба. Ж. микробиол., 1963, № 1, с. 73.

Король В. В. Метаболизм соединений серы у чумного и псевдотуберкулезного микробов. Автореф. дисс. канд. Ростов-на-Дону, 1973.

Король В. В., Домарадский И. В., Голубинский Е. П. Ассимиляция сульфатов чумным и псевдотуберкулезным микробами. Вопр. мед. химии, 1973, т. 19, № 2, с. 97.

Кротова В. А. Аминокислотный состав разновидностей чумного микроба, выращенных при различных условиях. Сообщение 1. Качественное исследование аминокислотного состава белков чумного микроба. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока, 1958, т. 18, с. 9.

Кротова В. А. Химический состав чумного микроба и выделенных из него водорастворимых фракций. Материалы конференции, посвящ. 50-летию ин-та «Микроб». Саратов, 1968, с. 77.

Кудлай Д. Г. Эписомы и инфекционная наследственность бактерий. М., 1969.

Кудлай Д. Г., Лиходед В. Г. Бактериоциногения. М., 1966.

Кудлай Д. Г., Чубуков Р. Ф., Оганесян М. Г. Генетика лекарственной устойчивости бактерий. М., 1972.

Кузьмиченко И. А. Некоторые особенности метаболизма субкультур чумного микроба, отличающихся зависимостью от кальция. Дисс. канд. Саратов, 1967.
Ларина В. С. Лизогения у чумного микроба. Материалы межинститутск. конференции по генетике —«Внехромосомные факторы наследственности у бактерий» 24—25 июня 1969 г. М., 1969а, с. 53.
Ларина В. С. Трансдукция стрептомицинорезистентности у чумного микроба с помощью умеренного фага Л-413 «С». Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1969б, № 6, с. 104.
Ларина В. С. Об умеренном бактериофаге возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 2, с. 65.
Ларина В. С., Анисимов П. И., Адамов А. К. Новый штамм чумного бактериофага для диагностики возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 1, с. 132.
Лебедева С. А. Некоторые свойства рекомбинантов чумного микроба, несущих эписому множественной лекарственной устойчивости. В кн.: Физиология и генетика микроорганизмов. Материалы конференции микробиологов Северного Кавказа (сентябрь 1969 г.). Ростов-на-Дону, 1969, с. 36.
Лебедева С. А., Домарадский И. В., Щербанюк А. И., Абрамова Л. А. Эффект совмещения в одной бактериальной клетке хромосомных и внехромосомных детерминантов антибиотикоустойчивости. Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов (Тезисы Всесоюзной конференции. М., 17—18 апреля 1973 г.), М., 1973, с. 291.
Лебедева С. А., Машанькин Б. Н. Инактивация хлорамфеникола чумными бактериями с эписомной устойчивостью к антибиотику. Антибиотики, 1972, № 9, с. 806.
Лебедева С. А., Машанькин Б. Н., Сучков Ю. Г. Эписомная резистентность чумного микроба к пенициллинам. Антибиотики, 1972, № 10, 908.
Лебедева С. А., Сучков Ю. Г., Домарадский И. В. Синтрофизм у чумного микроба и возможная биологическая роль этого явления. Бюлл. экспер. биол. мед., 1970, № 3, с. 79.
Линникова Л. В., Домарадский И. В., Мишанькин Б. Н. Влияние температуры культивирования на образование щелочной фосфатазы чумным микробом и некоторыми другими бактериями. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971, № 5, с. 57.
Лискина И. В. Определение живых чумных микробов в вакцинной взвеси на основании времени обесцвечивания метиленовой сини. Автореф. дисс. канд. Саратов, 1964.
Лосева Н. Л., Герасюк Л. Г., Домарадский И. В. Физико-химические и биологические свойства липополисахарида чумного микроба. В кн.: Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. В. 1, Изд. Ростовского университета, 1967, с. 332.
Лосева Н. Л., Домарадский И. В. О некоторых метаболитах окисления глицерина глицеринопозитивной разновидностью чумного микроба. В кн.: Биохимия, генетика и иммунология. Ростов-на-Дону, 1968, с. 3.
Майский В. Г. Различия в способности использовать экзогенные пурины при биосинтезе нуклеиновых кислот у некоторых штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов. Ж. микробиол., 1967а, № 7, с. 71.

Майский В. Г. Некоторые вопросы биосинтеза нуклеиновых кислот у чумного микроба. Автореф. дисс. канд. Ростов-на-Дону, 1967б.

Майский В. Г. Участие экзогенных пуринов и пуриннуклеотидов в биосинтезе нуклеиновых кислот чумного микроба. Вопр. мед. химии, 1968, т. 14, № 1, с. 48.

Майский В. Г., Сучков Ю. Г. Пути превращения экзогенного аденина в гуанин нуклеиновых кислот у чумного микроба. Вопр. мед. химии, 1970, т. 16, № 1, с. 72.

Мартиневский И. Л. Биология и генетические особенности чумного и близкородственных ему микробов. М., 1969.

Мартиневский И. Л. Ion-подобные мутанты чумного микроба. Генетика, 1972, т. 8, № 2, с. 145.

Мартиневский И. Л., Степанов В. М. О штаммах чумного микроба, зависимых от триптофана, и их обратных мутантах. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1972, № 3, с. 104.

Марченков В. И. Некоторые свойства ДНК и классификация пастерелл. Автореф. дисс. канд. Саратов, 1972.

Меринов С. П., Миронова Л. П., Хамзина А. М. Гликозидазы некоторых патогенных микроорганизмов. Докл. Иркутск. противочумного ин-та. В. 9. Иркутск, 1971, с. 56.

Михайлова Р. С., Беккер М. Л. Изменение свойств штамма ЕВ P. pestis под воздействием антисывороток энтеробактерий и нуклеотидный состав его ДНК. Ж. микробиол., 1966, № 10, с. 25.

Мишанькин Б. Н. Серологическое родство альдолазы чумного микроба с альдолазой других видов бактерий. Ж. микробиол., 1968, № 7, с. 114.

Мишанькин Б. Н., Домарадский И. В., Рыжко И. В. Инактивация фосфорилированием аминогликозидных антибиотиков штаммом ЕВ чумного микроба, несущим эписому множественной лекарственной устойчивости. Антибиотики, 1971, т. 16, № 12, с. 1081.

Мишанькин Б. Н., Сучков Ю. Г. Альдолазная активность индуцированных ауксотрофных мутантов чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 6, с. 66.

Мишанькин Б. Н., Сучков Ю. Г. Псевдолизогения у возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1973, № 2, с. 38.

Мужиченко А. В. К характеристике липидов чумного микроба. В кн.: Биохимия микробов и иммунохимия. Материалы к конференции 18—20 апреля 1966 г. Горький, 1966, с. 59.

Муравьева Н. К., Крайнова А. Н., Дроздовская Ф. К. Влияние глюкозы на рост и биологические свойства противочумной вакцины при выращивании культуры ЕВ в бульоне из ферментативного гидролизата казеина. В кн.: Производство бактерийных препаратов для профилактики и диагностики особо опасных инфекций (Сборник научных работ противочумных учреждений). Изд. Саратовского университета, 1966, с. 9.

Наумов А. В. Начальные этапы обмена глюкозы у генетически родственных субкультур чумного микроба. Автореф. дисс. канд. Саратов, 1970.

Николаенко Н. Т. Спонтанные ферментативные мутанты чумного микроба. В кн.: Физиология и генетика микроорганизмов. Материалы конференции микробиологов Северного Кавказа (сентябрь 1969 г.). Ростов-на-Дону, 1969, с. 17.

Новосельцев Н. Н. К характеристике умеренного чумного Н-фага. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970а, № 5, с. 74.
Новосельцев Н. Н. Получение стрептомициноустойчивых рекомбинантов чумного микроба методом трансдукции. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970б, № 1, с. 98.
Новосельцев Н. Н., Мишанькин Б. Н. Влияние лизогенизации Н-фагом на альдолазную активность чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 3, с. 73.
Новосельцев Н. Н., Рыжко И. В. О свойствах чумных микробов, лизогенизированных умеренным Н-фагом. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 5, с. 81.
Олениченва Л. С., Атарова Г. Т. Процессы переаминирования аминокислот у бактерий чумы. В кн.: Обмен аминокислот. Материалы Всесоюзной конференции. Тбилиси, 1967, с. 244.
Олениченва Л. С., Атарова Г. Т. О дезаминировании аминокислот чумным микробом. Укр. биохим. ж., 1968, т. 40, № 2, с. 213.
Олениченва Л. С., Атарова Г. Т. Синтез глютаминовой кислоты чумным микробом путем прямого аминирования α-кетоглутарата. В кн.: Физиология и генетика микроорганизмов. Материалы конференции микробиологов Северного Кавказа (сентябрь 1969 г.). Ростов-на-Дону, 1969, с. 68.
Олениченва Л. С., Сучков Ю. Г., Атарова Г. Т. Влияние температуры культивирования чумного микроба на синтез глютаминовой кислоты. Ж. микробиол., 1969, № 2, с. 137.
Орлова Г. М., Домарадский И. В., Сучков Ю. Г. и др. К вопросу о трансформации у чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971, № 4, с. 43.
Пак Г. Ю. Некоторые свойства индуцированных непестициногенных мутантов чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1969, № 1, с. 75.
Петровская В. Г. Проблемы вирулентности бактерий. Л., 1967.
Плакунов В. К. Специфичность устойчивости микроорганизмов к тетрациклинам и их производным. Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов (Тезисы Всесоюзной конференции. М., 17—18 апреля 1973 г.). М., 1973, с. 312.
Попова З. Н., Полиевитова О. И. Влияние температуры на обмен полифосфорных соединений чумного микроба штаммов EB и № 17. Труды Саратовск. мед. ин-та, 1970, т. 65 (82), с. 48.
Проценко О. А. Перенос хромосомных маркеров у чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1972, № 2, с. 5.
Проценко О. А., Анисимов П. И. Фертильность чумного микроба и анализ фенотипического проявления чужеродной информации у рекомбинантов, полученных в кроссах между возбудителем чумы и маркированными штаммами кишечной палочки. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1968, № 4, с. 217.
Проценко О. А., Анисимов П. И. Активность β-галактозидазы у чумного микроба и его lac+-рекомбинантов. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1969, № 5, 33.
Проценко О. А., Анисимов П. И. Взаимодействие эписомных факторов на модели возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1970, № 3, с. 78.

Рапопорт И. А. Особенности и механизм действия супермутагенов. В кн.: Супермутагены. М., 1966, с. 9.
Рублев Б. Д. Пути обмена глюкозы и глюконата и окислительное фосфорилирование у чумного микроба. Автореф. дисс. канд. Витебск, 1973.
Рублев Б. Д., Голубинский Е. П. О метаболизме глюкозы у P. pestis. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971, № 1, с. 62.
Рублев Б. Д., Голубинский Е. П., Домарадский И. В. Обмен глюконовой кислоты у чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971, № 3, с. 90.
Рудник В. С., Меринов С. П. Дегидрогеназная активность родственных субкультур чумного микроба, различающихся по вирулентности. Докл. Иркутск. противочумного ин-та. В. 9. Иркутск, 1971а, с. 54.
Рудник В. С., Меринов С. П. К вопросу о некоторых биохимических свойствах чумного микроба в связи с его вирулентностью. Докл. Иркутск. противочумного ин-та. В. 9. Иркутск, 1971б, с. 52.
Рыкова В. И., Домарадский И. В. Липолитическая активность некоторых патогенных микробов. Ж. микробиол., 1963, № 5, с. 14.
Ряпис И. В. Эффективность N-нитрозометилмочевины для индукции ауксотрофных мутантов микроба чумы. Дисс. канд. Ростов-на-Дону, 1971.
Ряпис И. В., Король В. В., Сучков Ю. Г., Домарадский И. В. Использование ауксотрофных мутантов для изучения возможности взаимного превращения цистеина и метионина у чумного микроба. Генетика, 1971а, т. 7, № 9, с. 155.
Ряпис И. В., Сучков Ю. Г., Логачева З. Н. Инактивация бактерий чумы N-нитрозо-N-метилмочевиной. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971б, № 6, с. 136.
Сагатовский В. Н. Оценка жизнеспособности микробов чумы по их дегидрогеназной активности. Автореф. дисс. канд. Саратов, 1966.
Сагатовский В. Н., Сагатовская Л. А. К вопросу об оценке вирулентности бактерий чумы восстановлением метиленовой сини и тетразол-хлорида. В кн.: Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. В. I. Изд. Ростовского университета, 1967, с. 234.
Сазыкин Ю. О. Биохимические механизмы резистентности к ингибиторам белкового синтеза. Итоги науки и техники. ВИНИТИ. Биол. химия. Т. 7. М., 1972.
Салганик Р. И. Специфичность радиационного и химического мутагенеза у микроорганизмов. В кн.: Генетические основы селекции микроорганизмов. М., 1969, с. 126.
Скавронская А. Г. Мутации у бактерий. М., 1967.
Соколова Н. М., Никитина Г. П. Получение устойчивых к стрептомицину вариантов чумного микроба под влиянием фильтрата стрептомициноустойчивого штамма. В кн.: Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций. Саратов,, 1965, с. 86.
Сомова А. Г. О составе популяций холерных вибрионов Эль Тор по признаку лизогенности. Ж. микробиол., 1971, № 7, с. 44.
Степанов В. М. Свойства некоторых ауксотрофных и гипотрофных мутантов чумного микроба. Автореф. дисс. канд. Алма-Ата, 1968.

Степанов В. М. Влияние аминокислот на рост возбудителя чумы. Материалы 6-й научной конференции противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана. В. I. Алма-Ата, 1969, с. 105.
Сучков Ю. Г. Различная потребность в аминокислотах и аммонийных солях у океанической и континентальной разновидностей чумного микроба. В кн.: Физиология и генетика микроорганизмов. Материалы конференции микробиологов Северного Кавказа (сентябрь 1969 г.). Ростов-на-Дону, 1969, с. 14.
Сучков Ю. Г., Богданова М. И., Мишанькин Б. Н. Антигенный состав и иммуногенность ауксотрофных мутантов вакцинного штамма ЕВ чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971а, № 2, с. 21.
Сучков Ю. Г., Голубинский Е. П. Индукция мутаций чумного микроба 8-азагуанином. В кн.: Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. В. I. Изд. Ростовского университета, 1967, с. 150.
Сучков Ю. Г., Голубинский Е. П. Инактивирующее и мутагенное действие некоторых агентов на чумной микроб. В кн.: Физиология и генетика микроорганизмов. Материалы конференции микробиологов Северного Кавказа (сентябрь 1969 г.). Ростов-на-Дону, 1969, с. 5.
Сучков Ю. Г., Домарадский И. В., Канатова Е. А. Аминокислотные потребности чумного микроба и неоднородность популяции по этому признаку. В кн.: Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. В. I. Ростов-на-Дону, 1967, с. 153.
Сучков Ю. Г., Домарадский И. В., Мишанькин Ю. Н., Ряпис И. В. Индуцированный мутагенез у чумного микроба и локализация некоторых генов на его хромосоме. Материалы 15-го Всесоюзного съезда эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов (тез. докл.). Ч. I. Тбилиси, 29 сентября — 3 октября 1970 г. Тбилиси, 1970, с. 230.
Сучков Ю. Г., Домарадский И. В., Ряпис И. В. Ауксотрофные мутанты чумного микроба, полученные после обработки N-нитрозометилмочевиной. Ж. микробиол., 1971б, № 3, с. 23.
Сучков Ю. Г., Макаровская Л. Н., Рыжко И. В., Щербанюк А. И. Мутагенное действие некоторых антибиотиков на чумной микроб. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971в, № 1, с. 87.
Сучков Ю. Г., Мишанькин Б. Н. Генетическое картирование хромосомы чумного микроба методом индуцированных мутаций. Генетика, 1972, т. 8, № 2, с. 140.
Сучков Ю. Г., Мишанькин Б. Н., Макаровская Л. Н. и др. Сравнительная мутагенная активность ультрафиолетовой радиации, азотистой кислоты и N-нитрозометилмочевины для чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1971 г., № 1, с. 170.
Таллмейстер Э. Т., Хейнару А. Л., Илометс Т. Я. О множественности механизмов устойчивости к антибиотикам при эписомной резистентности. Ж. микробиол., 1971, № 11, с. 23.
Терентьева Л. И. Вопросы питания возбудителя чумы в связи с культивированием на искусственных питательных средах. Автореф. дисс. канд. Алма-Ата, 1971.

Тимаков В. Д., Гольдфарб Д. М., Скавронская А. Г. Резистентность микроорганизмов как генетическая проблема. Вестн. АМН СССР, 1962, № 4, с. 70.
Тимофеева Л. А., Головачева В. Я. Влияние стимулятора Карпузиди и гемолизированной крови на размножение чумного и псевдотуберкулезного микробов и сальмонелл. Докл. Иркутск. противочумного ин-та. В. 6. Кызыл, 1969, с. 51.
Трофименко Н. З., Васильева З. И., Кротова В. А. Изменение аминокислотного состава питательной среды при глубинном выращивании чумного микроба. Известия Иркутск. гос. научно-исслед. противочумного ин-та Сибири и Дальнего Востока, 1958, т. 18, с. 117.
Туманский В. М. Микробиология чумы. М., 1958.
Тынянова В. И., Домарадский И. В. Независимая от НАД L-α-глицерофосфатдегидрогеназа чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1972, № 3, с. 118.
Тюлембаев М. А., Сулейменов Б. М. Влияние солей на свойства чумного микроба. I. Влияние хлористого натрия на биохимическую активность и вирулентность возбудителя чумы. Материалы 6-й научной конференции противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана. В. I. Алма-Ата, 1969, с. 122.
Шахтарин Р. А. К изучению состава нуклеиновых кислот вакцинного штамма EB. В кн.: Производство бактерийных препаратов для профилактики и диагностики особо опасных инфекций. Сборник научных работ противочумных учреждений. Изд. Саратовского университета, 1966, с. 407.
Шиманюк Н. Я. Декарбоксилазы аминокислот пастерелл и вибрионов. Автореф. дисс. канд. Витебск, 1972.

Altenbern R. Apparent genomic mapping of Staphylococcus aureus by a new method. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, v. 25, p. 346.
Altenbern R. A survey of genomic maps in strains of Staphylococcus aureus. Canad. J. Microbiol., 1969, v. 15, p. 959.
Aronson M., Bichowsky-Slomnicki L. Temperature and pH-dependent changes of electrophoretic mobility of Pasteurella pestis. J. Bact., 1960, v. 79, p. 734.
(Auerbach Ch.), Ауэрбах Ш. Роль мутагенной специфичности в получении мутаций. Генетика, 1966, № 1, с. 3.
Bannister D. Analysis of an R+ strain carrying two fi− factors. J. gen. Microbiol., 1970, v. 61, p. 273.
Baugh C., Lanham J., Surgalla M. Effects of bicarbonate on growth of Pasteurella pestis. 2. Carbon dioxide fixation into oxalacetate by cell—free extracts. J. Bact., 1964a, v. 88, p. 553.
Baugh C., Andrews A., Surgalla M. Effects of bicarbonate on growth of Pasteurella pestis. 3. Replacement of bicarbonate by pyrimidines. J. Bact., 1964b, v. 88, p. 1394.
Ben-Efraim S., Aronson M., Bichowsky-Slomnicki L. New antigenic component of Pasteurella pestis formed under specified conditions of pH and temperature. J. Bact., 1961, v. 81, p. 704.
(Bonner J., Varner J.), Боннер Д., Варнер Дж. Путь углерода в дыхательном метаболизме. В кн.: Биохимия растений. Под ред. Кретовича В. Л. М., 1968, с. 112.

Boyce R., Inamdar A., Ganapathi K. Metabolism of Pasteurella pestis: I. Metabolism of and incorporation into cells of some sugars and other carbon sources by growing cultures under shaken conditions. Indian J. Biochem., 1964, v. 1, p. 26.

Brownlow W., Wessman G. Nutrition of Pasteurella pestis in chemically defined media at temperatures of 36° C to 38° C. J. Bact., 1960, v. 79, p. 299.

Brubaker R. Interconversion of purine mononucleotides in Pasteurella pestis. Infect. Immun., 1970, v. 1, p. 446.

Brudaker R. R. The genus Yersinia: biochemistry and genetics of virulence. Curr. Topics in Microbiol., 1972, v. 57, p. 112.

Brubaker R., Sulen A. Mutations influencing the assimilation of nitrogen by Yersinia pestis. Infect. Immun., 1971, v. 3, p. 580.

Brubaker R., Surgalla M. The effect of Ca++ and Mg++ on lysis, growth, and production of virulence antigens by Pasteurella pestis. J. infect. Dis., 1964, v. 114, p. 13.

(Buchanan J.) Бьюкенен Дж. Биосинтез пуриновых нуклеотидов. В кн.: Нуклеиновые кислоты. Под ред. Чаргаффа Э. и Дэвидсона Дж. М., 1962, с. 254.

Burrows T. Virulence determinants in Pasteurella pestis and Pasteurella pseudotuberculosis. In: Proc. Symp. held during Diamond Jubilee of Haffkine Inst., 1960, p. 14.

Burrows T., Bacon G. The effect of loss of different virulence determinants on the virulence and immunogenicity of strains of Pasteurella pestis. Brit. J. exp. Path., 1958, v. 39, p. 278.

Burrows T., Gillett W. The nutritional requirements of some Pasteurella species. J. gen. Microbiol., 1966, v. 45, p. 333.

Burrows T., Farrell J., Gillett W. The catalase activities of Pasteurella pestis and other bacteria. Brit. J. exp. Path., 1964, v. 45, p. 579.

Cerdá-Olmedo E., Hanawalt P. The replication of the Escherichia coli chromosome studied by sequential nitrosoguanidine mutagenesis. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., New York, 1968, v. 33, p. 599.

Davies D. A. A specific polysaccharide of Pasteurella pestis. Biochem. J., 1956, v. 63, p. 105.

Dodin A., Brygoo E. Activité succinodeshydrogenasique de Pasteurella pestis, souche EV. 1. Etude colorimetrique. Arch. Inst. Pasteur Madagascar, 1960, t. 28, p. 13.

Doudoroff M. Studies on the nutrition and metabolism of Pasteurella pestis. Proc. Soc. exp. Biol., 1943, v. 53, p. 73.

Englesberg E. The irreversibility of methionine synthesis from cysteine in Pasteurella pestis. J. Bact., 1952, v. 63, p. 675.

Englesberg E. Mutation to rhamnose utilization in Pasteurella pestis. J. Bact., 1957a, v. 73, p. 641.

Englesberg E. Physiological basis for rhamnose utilization by a mutant of Pasteurella pestis. 1. Experiments with resting cells; the isolation of lactic aldehyde. J. Bact., 1957b, v. 74, p. 8.

Englesberg E. Physiological basis for rhamnose utilization by a mutant of Pasteurella pestis. 2. A single mutational event leading to the production of two enzymes. Arch. Biochem., 1957c, v. 71, p. 179.

Englesberg E., Gibor A., Levy J. Adaptive control of terminal respiration in Pasteurella pestis. J. Bact., 1954, v. 68, p. 146.
Englesberg E., Levy J. Induced synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes as correlated with the oxidation of acetate and glucose by Pasteurella pestis. J. Bact., 1955, v. 69, p. 418.
(Freese E.) Фриз Э. Молекулярный механизм мутаций. В кн.: Молекулярная генетика. М., 1964, с. 226.
Fukui G., Delwiche E., Mortlock R., Surgalla M. Oxidative metabolism of Pasteurella pestis grown in vitro and in vivo. J. infect. Dis., 1962, v. 110, p. 143.
Gadgil M., Nimbkar Y., Ihaba H. The role of nutrients and temperature in the growth of Pasteurella pestis for vaccine production. I. Effect of Ca++ and Mg++ on the growth of Pasteurella pestis in relation to the temperature of incubation. Indian. J. Path. Bact., 1967a, v. 10, p. 235.
Gadgil M., Nimkar Y., Ihaba H. Temperature induced growth imbalance of Pasteurella pestis in relation to RNA, DNA and protein synthesis. Indian J. Path. Bact., 1967b, v. 10, p. 127.
Ginoza H., Painter R. Genetic recombination between the resistance transfer factor and the chromosome of Escherichia coli. J. Bact., 1964, v. 87, p. 1339.
Girard G. Caractères généraux des mutants pseudolysogènes sélectionnés chez Pasteurella pestis par les bactériophages. Déductions epidemiologiques. C. R. Soc. Biol., 1957, t. 151, p. 1068.
Hashimoto H., Hirota Y. Gene recombination and segregation of resistance factor R in Escherichia coli. J. Bact, 1966, v. 91, p. 51.
Herbert D. Studies on the nutrition of Pasteurella pestis, and factors affecting the growth of isolated cells on an agar surface. Brit. J. exp. Path., 1949, v. 30, p. 509.
Higuchi K., Carlin C. Studies on the nutrition and physiology of Pasteurella pestis. I. A casein hydrolysate medium for the growth of Pasteurella pestis. J. Bact., 1957, v. 73, p. 122.
Higuchi K., Carlin C. Studies on the nutrition and physiology of Pasteurella pestis. 2. A defined medium for the growth of Pasteurella pestis. J. Bact., 1958, v. 75, p. 409.
Higuchi K., Kupferberg L., Smith J. Studies on the nutrition and physiology of Pasteurella pestis. 3. Effects of calcium ions on the growth of virulent and avirulent strains of Pasteurella pestis. J. Bact., 1959, v. 77, p. 317.
Hills G., Spurr E. The effect of temperature on the nutritional requirements of Pasteurella pestis. J. gen. Microbiol., 1952, v. 6, p. 64.
Клиническая ферментология. Под ред. Щеклина Э. Варшава, 1966.
Knapp W., Lebek G. Übertragung der infektiösen Resistenz auf Pasteurellen. Path. et Microbiol., 1967, v. 30, p. 103.
Lawrence K., Mulczyk M. The transfer of two episomes: colicinogenic factor I and RTF in Shigella flexneri strain by crossing between strains each possesing a single episome. J. gen. Microbiol., 1965, v. 39, p. 209.
Lawton W., Stull H. Chromosome mapping of Pasteurella pseudotuberculosis by interrupted mating. J. Bact., 1971, v. 105, p. 855.

Lawton W., Stull H. Gene transfer in Pasteurella pestis harboring the F'Cm plasmid of Escherichia coli. J. Bact., 1972, v. 110, p. 926.
Lawton W., Morris B., Burrows T. Gene transfer by conjugation in Pasteurella pseudotuberculosis and Pasteurella pestis. Intern. Symp. on Pseudotuberculosis, Paris, 1967; Sypm. Series immunol. Stand (Karger. Basel, New York), 1968, v. 9, p. 285.
Levine H., Weimberg R., Dowling J. e. a. The oxidative dissimilation of serine by Pasteurella pestis. J. Bact., 1954, v. 67, p. 369.
Little R. V., Brubaker R. R. Characterization of deoxyribonucleic acid from Yersinia pestis by ethidium bromide—cesium chloride density gradient centrifugation. Infect. Immun., 1972, v. 5, p. 630.
Martin G., Jacob F. Transfert de l'épisome sexuel d'Escherichia coli á Pasteurella pestis. C. R. Acad. Sci. (Paris), 1962, t. 254, p. 3589.
McMahon P. High-frequency gene transfer in Pasteurella pseudotuberculosis. J. gen. Microbiol., 1971, v. 69, p. 405.
Meynell E., Meynell G., Datta N. Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. Bact. Rev., 1968, v. 32, p. 55.
Misra J., Agarwala S., Shrivastava D. Studies in the enzyme make—up of Pasteurella pestis. 7. Deamination of purine and pyrimidine compounds by virulent and avirulent strains. Indian J. Med. Res., 1960, v. 48, p. 1.
Mollaret H. Le Bacille de Malassez et Vignal. Caractères culturaux et biochimiques. Thèse medicine. Paris, 1962.
Molnar D., Lawton W. Growth of male-specific bacteriophage in Pasteurella harboring F-genotes derived from Escherichia coli. J. Virol., 1971, v. 7, p. 24.
Morris B., Burrows T. Gene transfer studies with Pasteurella pseudotuberculosis. Intern. Symp. on Pseudotuberculosis. Paris, 1967; Symp. Series immunol. Stand. (Karger, Basel, New York), 1968, v. 9, p. 275.
Mortlock R. Gluconate metabolism of Pasteurella pestis. J. Bact., 1962, v. 84, p. 53.
Mortlock R., Brubaker R. Glucoso-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activites of Pasteurella pestis and Pasteurella pseudotuberculosis. J. Bact., 1962, v. 84, p. 1122.
Nair Sh., Modak M., Venkataraman A. Cellular constituents of Pasteurella pestis. Indian J. Biochem., 1966, v. 3, p. 206.
Nisioka T., Mitani M., Clowes R. Molecular recombination between R-factor deoxyribonucleic acid molecules in Escherichia coli host cells. J. Bact., 1970, v. 103, p. 166.
Pearce L., Meynell E. Specific chromosomal affinity of a resistance factor. J. gen. Microbiol., 1968a, v. 50, p. 159.
Pearce L., Meynell E. Mutation to high-level streptomycin-resistance in R+ bacteria. J. gen. Microbiol., 1968b, v. 50, p. 173.
Pollitzer R. Plague. Wld. Hlth Org. Monograph. Ser. 22. Geneva, 1954.
Rao M. Oxidations effected by the plague bacillus. Indian J. Med. Res., 1940a, v 27, p. 617.
Rao M. Further studies on the nutrition of the plague bacillus: the role of haematin and other compounds. Indian J. Med. Res., 1940b, v. 27, p. 833.

Reeve E. Characteristics of some single-step mutants to chloramphenicol resistance in Escherichia coli K-12 and their interactions with R-factor genes. Gen. Res. (Camb.), 1966, v. 7, p. 281.

Richaud J., Brygoo E. Essai de culture de Yersinia pestis en présence d'acide folique. Arch. Inst. Pasteur Madagascar, 1970, t. 39, p. 13.

Rockenmacher M. Relationship of catalase activity to virulence in Pasteurella pestis. Proc. Soc. exp. Biol., 1949, v. 71, p. 99.

Rockenmacher M., James H., Elberg S. Studies on the nutrition and physiology of Pasteurella pestis. I. A chemically defined culture medium for Pasteurella pestis. J. Bact., 1952, v. 63, p. 785.

(Rolinson G.) Ролинсон Г. Устойчивость бактерий. Антибиотики, 1971, № 6, с. 519.

Sagar P., Agarwala S., Shrivastava D. Studies in the enzyme make-up of Pasteurella pestis. I. Deamination of amino acids by virulent and avirulent strains. Indian J. Med. Res., 1956, v. 44, p. 385.

Santer M., Ajl S. Metabolic reactions of Pasteurella pestis. I. Terminal oxidation. J. Bact., 1954, v. 67, p. 379.

Santer M., Ajl S. Metabolic reactions of Pasteurella pestis. 2. The fermentation of glucose. J. Bact., 1955a, v. 69, p. 298.

Santer M., Ajl S. Metabolic reactions of Pasteurella pestis. 3. The hexose monophosphate shunt in the growth of P. pestis. J. Bact., 1955b, v. 69, p. 713.

Saxena K., Sagar P., Agarwala S., Shrivastava D. Studies in the enzyme make-up of Pasteurella pestis. 4. Transamination reactions in virulent and avirulent strains. Indian J. Med. Res., 1957, v. 45, p. 161.

Seal S. Isolation of an active polysaccharide fraction from plague organisms. Proc. Soc. exp. Biol., 1951, v. 77, p. 675.

Smith J., Higuchi K. Studies on the nutrition and physiology of Pasteurella pestis. 4. Utilization of peptides during the growth of Pasteurella pestis. J. Bact., 1959, v. 77, p. 604.

Sompolinsky D., Samra Z. Mechanism of high-level resistance to chloramphenicol in different Escherichia coli variants. J. gen. Microbiol., 1968, v. 50, p. 55.

Srikantan T., Agarwala S., Shrivastava D. Studies in the enzyme make—up of Pasteurella pestis. 5. Dehydrogenase activity of virulent and avirulent strains. Indian J. Med. Res., 1957, v. 45, p. 467.

Sugino Y., Hirota Y. Cojugal fertility associated with resistance factor R in Escherichia coli. J. Bact., 1962, v. 84, p. 902.

Watanabe T., Lyang K. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. 5. Spontaneous segregation and recombination of resistance factors in Salmonella typhimurium. J. Bact., 1962, v. 84, p. 422.

Watanabe T., Ogata Y. Genetic stability of various resistance factors in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J. Bact., 1970, v. 102, p. 363.

Woodward G. The ribonuclease activity of Pasteurella pestis (Plague bacillus). J. Biol. Chem., 1944, v. 156, p. 143.

Yang G., Brubaker R. Effect of Ca^{2+} on the synthesis of deoxyribonucleic acid in virulent and avirulent Yersinia. Infect. Immun., 1971, v. 3, p. 59.

Biochemistry and Genetics of Plague Microbe.

DOMARADSKIJ I. V., GOLUBINSKY E. P., LEBEDEVA S. A.,
SUCHKOV YU. G.

Prof. I. V. Domaradskij, Associate Member of the USSR Academy of Med. Sci., is Director of the Research Antiplague Institute. His coauthors are staff members of the same Institute.

The book deals with modern biological aspects of the problem of plague — biochemistry and genetics of its pathogenic agent. Summarized results of original investigations on biology of the plague microbe and review of the available literature are presented. Prospects for further research in this field are outlined.

The work will be of interest for medical practitioners, microbiologists, research workres concerned with problems of infectious pathology.

ОГЛАВЛЕНИЕ

И. В. Домарадский, Е. П. Голубинский, С. А. Лебедева,
Ю. Г. Сучков

БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Научн. редактор *В. А. Логинов*
Художественный редактор *О. А. Четверикова*
Корректор *О. П. Зубарева.* Техн. редактор *Т. В. Яковлева.*
Переплет художника *Н. А. Гурова.*

Сдано в набор 27/VIII 1973 г. Подписано к печати 8/I 1974 г.
Формат бумаги $84\times108^{1}/_{32}$ печ. л. 5,25 (условных 8,82 л.) 9,69
уч.-изд. л. Бум. тип. № 2. Тираж 3 000 экз. Т-01010 МН-72

Издательство «Медицина». Москва, Петроверигский пер., 6/8
Заказ № 6541. Цена 1 р. 08 к.

Типография им. Смирнова Смоленского облуправления
издательств, полиграфии и книжной торговли, г. Смоленск,
пр. им. Ю. Гагарина, 2.

1 р. 08 к.

• БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ •